



Étude du rôle des canaux potassiques de fond TREK dans la douleur et l'analgésie par la morphine

Marine Christin

► To cite this version:

Marine Christin. Étude du rôle des canaux potassiques de fond TREK dans la douleur et l'analgésie par la morphine. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4119 . tel-01135445

HAL Id: tel-01135445

<https://theses.hal.science/tel-01135445>

Submitted on 25 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
UFR Sciences

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Soutenue et présentée par :

Marine Christin

Le 11 Décembre 2014

**ÉTUDE DU RÔLE DES CANAUX
POTASSIQUES DE FOND TREK DANS LA
DOULEUR ET L'ANALGÉSIE PAR LA
MORPHINE**

Thèse dirigée par le Pr. Jacques NOËL

JURY

Pr. Laurent COUNILLON
Pr. Marc LANDRY
Dr. Xavier GASULL
Dr. Jérôme BUSSEROLLES
Pr. Jacques NOËL

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

RÉSUMÉ

La perception des stimuli nocifs est essentielle à la survie d'un organisme vivant. Elle lui permet de produire une réponse appropriée afin d'éviter une situation potentiellement dangereuse. La détection de ces stimuli a lieu au niveau des terminaisons périphériques de neurones sensoriels spécialisés, les nocicepteurs. Ces neurones sont responsables de la transduction des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques en potentiels d'action et transmettent cette information vers la moelle épinière. La stimulation des nocicepteurs en périphérie repose sur le profil d'expression de canaux ioniques spécifiques à la membrane plasmique des terminaisons nerveuses.

Je me suis intéressée pendant ma thèse à étudier l'implication dans la perception douloureuse des canaux potassiques de fond de la famille TREK. Ces canaux appartiennent à la famille des canaux potassiques à deux domaines pores, domaines P (K_{2P}), qui jouent un rôle majeur dans l'excitabilité cellulaire. La sous-famille TREK comprend trois membres, TREK-1, TREK-2 et TRAAK. Ce sont des canaux mécano- et thermosensibles activés par les acides gras polyinsaturés qui ont été impliqués dans l'anesthésie, la dépression et la neuroprotection. Lors de précédentes études, notre équipe a pu montrer que les canaux TREK-1 et TRAAK sont des senseurs moléculaires essentiels dans la perception polymodale de la douleur et qu'ils interviennent dans l'excitabilité des nocicepteurs, modulant ainsi le message douloureux. Mon projet de thèse s'est directement inscrit dans la poursuite de l'étude du rôle des canaux TREK dans la physiologie de la nociception grâce à l'utilisation de souris invalidées pour ces canaux.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à étudier l'implication du canal TREK-1 dans l'activité antalgique et dans les effets secondaires de l'un des analgésiques les plus couramment utilisés, la morphine. Nous avons montré l'existence d'une relation fonctionnelle entre les canaux TREK et les récepteurs opioïdes μ et δ (μ OR et δ OR), qui sont les principaux récepteurs aux opioïdes impliqués dans l'analgésie. Nous avons mis en évidence, dans des systèmes d'expression hétérologue, un couplage fonctionnel entre TREK-1 et TREK-2 et les récepteurs μ OR et δ OR. Par des études en imagerie calcique sur des neurones sensoriels de ganglions spinaux et des neurones de moelle épinière en culture, nous avons montré que le canal TREK-1 est impliqué dans les effets périphériques et centraux de la morphine. Ces travaux ont permis d'impliquer le canal TREK-1 comme un médiateur de l'analgésie induite par la morphine agissant en aval des récepteurs aux opioïdes.

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai cherché à établir le rôle du canal TREK-2 dans la perception de la douleur. TREK-2 est l'un des canaux potassiques de fond le plus exprimé dans les neurones sensoriels de DRG et il est activé par la déformation mécanique de la membrane plasmique et par la température, comme le canal TREK-1. J'ai étudié l'impact des canaux TREK-2 sur l'activité des nocicepteurs avec des approches complémentaires *in vitro* et *ex vivo* sur des souris invalidées pour le canal TREK-2 (TREK-2^{-/-}) et pour l'ensemble des canaux TREK (TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}). Les études comportementales sur ces lignées de souris ont été menées en parallèle par une collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur (INSERM U766) de Clermont-Ferrand. J'ai pu montrer que le canal TREK-2 module la perception thermique des nocicepteurs cutanés. Toutefois, j'ai observé que l'activité de TREK-2 dans la thermo perception est complémentaire de celle déjà rapportée pour les canaux TREK-1 et TRAAK car, contrairement à TREK-1 et TRAAK, TREK-2 intervient dans la perception de températures non nocives. Les canaux TREK contribuent donc à la perception thermique dans des gammes de température différentes.

L'ensemble de ces travaux de thèse montrent que les canaux potassiques de fond TREK jouent un rôle essentiel dans la perception et la modulation du message douloureux et pourraient être des cibles intéressantes pour le traitement de la douleur.

Mots clés : canaux TREK, thermosensibilité, morphine, nerf-peau, imagerie calcique, patch-clamp.

ABSTRACT

The perception of noxious stimuli is essential to an organism survival as it allows the appropriate avoidance response to potentially harmful situations. This detection occurs at the peripheral terminals of specialized sensory neurons - nociceptors. These neurons of small diameter transduce stimuli of a thermal, mechanical or chemical nature into action potentials and transmit this information to the spinal-cord. The stimulation of nociceptors at the periphery by the different stimuli relies on the expression profile of specific ion channel transducers at the plasma membrane of the axon terminals.

During my PhD, I studied the implication of background potassium channels TREK in the perception of pain. TREK channels are part of the two-pore domains potassium channels family (K_{2p}) which play a major role in neuronal excitability and cell firing. The TREK channels subfamily is composed of TREK-1, TREK-2 and TRAAK. They are mechano- and thermo-activated channels, sensitive to polyunsaturated fatty acids, which have been involved in anesthesia, depression and neuroprotection. Previous studies from our group demonstrated that TREK-1 and TRAAK channels are essential molecular sensors in polymodal pain perception and that they are involved in the excitability of nociceptors, thus modulating the nociceptive message. My PhD project was in direct line with the pursuit of the study of TREK channels in nociception, using knock-out mice.

In the first part of this work, I investigated the implication of TREK-1 channel in the analgesic action and the adverse side effects of morphine, one of the most used analgesic. We show that there is a functional relation between TREK channels and opioid receptors μ and δ (μ OR and δ OR), which are the main opioid receptors involved in analgesia. We reveal, in heterologous expression system, a functional coupling between TREK-1 and TREK-2 channels and receptors μ OR and δ OR. Using calcium imaging on cultured sensory dorsal root ganglion neurons and spinal cord neurons, we show that TREK-1 channel is involved in peripheral and central effects of morphine. This work demonstrate that TREK-1 channel, downstream of the μ OR, is an important mediator of morphine induced analgesia.

During the second part of my work, I investigated the role of TREK-2 channel in pain perception. TREK-2 is the major background K^+ current in dorsal root ganglion neurons and, just like TREK-1, it can be activated by membrane stretch and temperature. I assessed the impact of this channel on nociceptors with complementary *in vitro*, *ex vivo* approaches on mice lacking TREK-2 channel (TREK-2^{-/-}) and the whole TREK channels subfamily (TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}). Behavioral studies of those two strains of mice were carried out by our collaborators in the Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur (INSERM U766) of

Clermont-Ferrand. We reveal that TREK-2 channel modulates thermal perception of cutaneous nociceptors. However, we show that TREK-2 activity in thermal perception complements the one already reported for TREK-1 and TRAAK channels. Whilst TREK-1 and TRAAK are involved in noxious temperatures perception, TREK-2 intervene in non-aversive temperatures detection. Therefore, each member of the TREK channels subfamily contributes to thermal perception in different temperature ranges.

Taken together, these results show that background potassium channels TREK are major contributors to pain message perception and transmission and that they might be interesting targets for the treatment of pain.

Keywords: *TREK channels, thermosensitivity, morphine, nerve-skin, calcium imaging, patch-clamp.*

REMERCIEMENTS

À mes chefs :

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. **Jacques Noël**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de m'encadrer d'abord pour mon stage de Master, puis pour ma thèse. Merci de m'avoir formée, tant scientifiquement que personnellement, et de m'avoir guidée tout au long de cette belle aventure. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie, car en plus de vos précieux conseils, vous avez été à l'écoute m'avez supportée (dans tous les sens du terme !). En m'accordant votre confiance, vous m'avez permis de m'épanouir et de trouver ma voie scientifique. J'espère en être digne dans les années à venir.

Je remercie également le Dr. **Éric Lingueglia**, qui m'a permis d'intégrer son équipe, il y a déjà quatre ans maintenant. Tes conseils avisés sur mon projet et mon avenir, ta disponibilité et ta bienveillance m'ont été d'un grand soutien pendant ma thèse. Je te remercie aussi pour les nombreux congrès auxquels j'ai pu participer.

Aux membres du Jury :

Je voudrais remercier sincèrement les membres de mon jury de thèse :

- le Pr. **Laurent Counillon** qui a accepté d'être Président de ce jury. Je lui en suis d'autant plus reconnaissante qu'il a été mon professeur pendant toutes mes années universitaires, de la Licence au Master. C'est une belle façon de boucler la boucle ;
- le Dr. **Xavier Gasull**, qui a aimablement accepté de venir d'Espagne pour être le rapporteur de ma thèse ;
- le Pr. **Marc Landry** qui a accepté d'examiner ce travail ;
- le Dr. **Jérôme Busserolles** qui a grandement contribué à ce projet, jusqu'à participer à ce jury de thèse, et que je tiens à remercier pour cette collaboration fructueuse ;

À l'Équipe :

Il m'est difficile d'exprimer en quelques mots le plaisir que j'ai eu à faire partie de cette équipe soudée et pleine de bonne humeur. Tant pour nos échanges scientifiques que pour nos pots réguliers et nos « retraites » annuelles au ski, chaque occasion de se réunir est un bon moment. Merci tout d'abord à mes voisins de bureau, **Anne B.** pour sa bonne humeur, son soutien et son aide précieuse (en particulier pour les dossiers administratifs sans fin !), **Manu** pour ses nombreux conseils, sa disponibilité et son humour, **Magda** pour nos longues discussions enrichissantes et ta capacité à « visualiser » qui m'a fait tellement rire. Merci également à **Seb**, qui

a eu la gentillesse de me transporter maintes et maintes fois, nos trajets en voiture ont été l'occasion de nombreux fous rires, de coups de gueule et de discussions philosophiques (ou pas). Je me souviendrai des fameux craquages du vendredi soir (DEDEEEEEEEEE !!!). Merci aussi à **Miguel**, pour ses conseils et ses théories farfelues dont il a le secret, à **Sylvie**, notre spécialiste des petites bêtes que j'apprécie tant, pour sa bonne humeur sans faille, à **Thomas** pour ses blagues souvent douteuses mais qui, je l'avoue, me faisaient rire. Et évidemment un grand merci à **Valérie**, que j'ai embêtée tant de fois avec mes manips de biomol, pour ses conseils, sa gentillesse, et toutes ces douceurs qu'elle nous a préparées (et dont il est difficile de ne pas abuser !). Je n'oublie pas ceux qui sont partis pour de nouvelles aventures, **Anne D.**, compagne de galère pendant quelques années, avec qui j'ai partagé le bon et le moins bon et qui a toujours été à mon écoute, **Perrine**, ma « grande sœur » de la science, qui a été très présente pendant les moments de doute et qui m'a grandement conseillé pendant ma thèse (et merci à toi de faire le déplacement pour venir assister à ma soutenance même si je sais que ce n'est qu'un prétexte pour redescendre dans le sud et fuir le froid strasbourgeois). Et bien sûr, merci à mes deux « patates » **Laura** et **Mérodie**, les deux petites folles, pour votre bonne humeur permanente, vos petites blagues et vos délires qui égayaient nos journées.

Aux collègues de l'institut :

Merci tout d'abord à tous les collègues de l'étage, avec qui j'ai beaucoup partagé. L'équipe Martin : **Steph**, **Gwen**, **Carole**, **Anouar** et **Fred** (les garçons, je garde en tête notre séjour à Milan, n'oubliez pas que j'ai encore des photos et vidéos dossier !!) ; l'équipe Mantegazza : **Massimo**, **Sandrine**, **Fabrice**, **Oana** et en particulier **Jen** et **Marion**, merci à vous les filles pour votre folie douce et tous ces moments de craquage complets qui m'ont fait un bien fou !

Merci aussi à mes copines du -1, **Mérodie** et **Sandrine**, qui m'ont été d'un grand soutien et qui ont accompagné mes journées pendant ma rédaction. Vous êtes de super nanas et je suis bien contente de vous compter parmi mes amis.

Une pensée pour **Véro**, qui s'est occupée avec soin de mes petites bestioles à poil et avec qui j'ai pris grand plaisir à discuter de tout et de rien.

Et merci à tous les autres, et je vais forcément en oublier, avec qui j'ai partagé pendant ma thèse, **Cathy**, notre super gestionnaire (je ne te remercierai jamais assez pour tes coups de main pour la gestion des commandes, déplacements... mais aussi pour nos nombreuses discussions passionnantes), l'inimitable **Hélène**, **Thierry** pour ses conseils, et mes compagnons de pauses caféinées et nicotinées, dont **Greg**, **Joachim** et surtout **Émilie**, qui m'accompagne depuis la Licence.

À nos collaborateurs :

Je tiens à remercier particulièrement l'équipe du Pr. **Alain Eschaliér**, du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur (INSERM U766) of Clermont-Ferrand avec qui nous collaborons depuis le début de ce projet, en particulier **Vanessa** et **Mailly** qui ont réalisé avec le Dr. **Jérôme Busserolles**, les expériences comportementales pour ce projet.

À mes proches :

Car sans eux rien n'aurait été pareil, je tiens à remercier mes amis, ceux qui m'ont accompagnée, soutenue pendant ces années intenses. Ma **Brit'** d'abord parce que c'est elle, parce qu'elle est là depuis le début et qu'elle le sera encore longtemps. Merci à **Mimi & Thib**, pour tout, pour nos moments passés ensemble, à chaque fois inoubliables, et pour m'avoir autant épaulée dans la dernière ligne droite. Merci aux girls : **Céline, Alice, Marion**, pour ces soirées filles sans fin, un pur moment de détente, de fous rires et d'amitié. Et je n'oublie pas **Ben & Hélène, Vivou & Val, Aurore S., Aurore P., Romain, Hugo & Maud** et bien d'autres avec qui j'ai partagé tant de belles choses et qui se sont toujours montrés présents.

Un immense merci à ma famille, qui a toujours été là, qui m'a accompagnée tout au long de mon parcours et sans qui je ne serai pas arrivée où j'en suis. Merci à **mes parents** pour leur soutien sans faille, leurs encouragements et leur amour. Et bien sûr une dédicace spéciale à **ma Rock Star de sœur**, pour tous ces moments de complicité partagés. Thanks Sis' !

À Fe :

Enfin, merci à toi d'avoir été là, d'avoir partagé tous ces moments avec moi, les bons comme les moins bons. Plus que quiconque, tu as su m'écouter et m'encourager. Ton amour et ton soutien ont été plus qu'importants dans la réussite de ce projet. Sans toi rien n'aurait été pareil. Maintenant c'est une nouvelle aventure qui commence...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
INTRODUCTION	9
I DOULEUR : GÉNÉRALITÉS ET PHYSIOLOGIE	9
A. Généralités.....	9
1. La douleur, un problème de santé publique	9
2. Historique	9
B. Anatomie de la douleur	14
1. Périphérie	14
a. Classification fibres afférentes.....	15
b. Mécanorécepteurs	17
c. Thermorécepteurs	19
> Récepteurs au froid	19
> Récepteurs au chaud	20
d. Nocicepteurs.....	20
> Les fibres Aδ nociceptives.....	20
> Les fibres C nociceptives.....	21
2. Mécanismes spinaux de la nociception.....	22
a. Projections centrales des nocicepteurs	22
b. Modulation spinale de la nociception	24
3. Voies ascendantes et traitement supra-spinal de la nociception	25
II TRANSDUCTION DU MESSAGE NOCICEPTIF : RÔLE DES CANAUX IONIQUES.....	27
A. Les canaux TRP	29
1. TRPV1 (VR1)	30
2. TRPV2 (VRL-1)	33
3. TRPV3 (VRL-2)	33
4. TRPV4 (VROAC)	34
5. TRPM8 (CMR1).....	34
6. TRPA1 (ANKTM1)	36
7. Autres canaux TRP impliqués dans la thermo sensation.....	37
B. Les canaux ASIC	39
1. Structure, expression, régulations	39
2. Canaux ASIC et douleur.....	41
C. Les canaux Piezo	43
1. Structure, expression et régulations	43
2. Rôle des canaux Piezo dans la nociception	45
D. Les canaux sodiques dépendants du voltage (Na _v)	45
1. Na _v 1.7	46
2. Na _v 1.8	47
3. Na _v 1.9	47
4. Autres canaux Na _v	48
E. Les canaux potassiques dans la douleur	48

III LES CANAUX TREK	51
A. Le canal TREK-1.....	53
1. Propriétés électrophysiologiques	54
2. Régulations et partenaires protéiques.....	54
a. Pharmacologie	54
b. Mécanosensibilité.....	55
c. Thermosensibilité.....	56
d. Modulation par les lipides cellulaires	57
e. Sensibilité au pH	57
f. Modulation par les neurotransmetteurs	58
g. Modulation par le cytosquelette	58
h. Partenaires protéiques	58
3. Rôles physiologiques : étude des souris KO	61
a. TREK-1 et anesthésie générale.....	61
b. TREK-1 et neuroprotection	61
c. TREK-1 et dépression	62
d. TREK-1 et perception douloureuse.....	62
B. Le canal TRAAK	64
1. Propriétés électrophysiologiques	64
2. Régulations et partenaires protéiques.....	65
3. Rôles physiologiques : étude des souris KO.....	67
C. Le canal TREK-2.....	72
1. Propriétés électrophysiologiques	73
2. Régulations et partenaires protéiques.....	73
3. Rôles physiologiques : étude des souris KO	76
IV L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE : RÔLE DES CANAUX POTASSIQUES	78
RÉSULTATS PARTIE 1 : ÉTUDE DU RÔLE DES CANAUX TREK DANS L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE.....	83
I RÉSULTATS	83
A. <i>Couplage fonctionnel entre les canaux TREK et les récepteurs opioïdes</i>	83
1. Le canal TREK-1 et les récepteurs opioïdes.....	83
2. Les canaux TREK-2 et TRAAK et les récepteurs μ OR	85
B. <i>Implication de TREK-1 dans l'activité de la morphine sur les neurones de corne dorsale de moelle épinière</i>	86
C. <i>Implication de TREK-1 dans l'effet de la morphine sur les neurones de DRG</i>	90
II DISCUSSION	93
RÉSULTATS PARTIE 2 : ÉTUDE DU RÔLE DU CANAL TREK-2 DANS LA DOULEUR	99
I RÔLE DU CANAL TREK-2 DANS LES NEURONES DE DRG.....	99
II RÔLE DE TREK-2 DANS LA PERCEPTION THERMIQUE	101
A. <i>Impact de TREK-2 dans la perception au chaud</i>	101
1. Étude sur des neurones sensoriels de DRG par imagerie calcique	101
2. Étude des fibres C nociceptives : enregistrements nerf-peau.....	102
B. <i>Rôle du canal TREK-2 dans la perception du froid</i>	107
1. Étude des réponses au froid des neurones sensoriels de DRG par imagerie calcique	107
2. Étude de la sensibilité au froid des fibres C nociceptives : enregistrements nerf-peau	109
III ÉTUDE DES SENSIBILITÉS THERMIQUES DES SOURIS TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-}	112

A. <i>Étude de la perception au chaud des neurones sensoriels des souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}</i>	112
B. <i>Étude de la perception au froid des neurones sensoriels des souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}</i>	116
IV RÔLE DE TREK-2 DANS L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE	119
A. <i>Effet de la morphine sur la thermosensibilité de fibres sauvages</i>	119
B. <i>Effet de la morphine sur la thermosensibilité de fibres TREK-2^{-/-}</i>	120
V DISCUSSION	122
A. <i>TREK-2 est impliqué dans la perception du chaud modéré</i>	122
B. <i>TREK-2 est impliqué dans la perception du froid modéré</i>	126
CONCLUSION GÉNÉRALE	133
MATÉRIEL ET MÉTHODES	137
I ANIMAUX	137
II CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES SENSORIELS DE DRG	138
III CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES DE MOELLE ÉPINIÈRE	138
IV IMAGERIE CALCIQUE	139
V ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES	140
A. <i>Enregistrements de patch-clamp</i>	140
B. <i>Mesure du potentiel de repos des neurones de DRG en culture</i>	141
VI ENREGISTREMENTS DE FIBRES C UNITAIRES, TECHNIQUE DE NERF-PEAU	142
VII STATISTIQUES	143
ANNEXES : ARTICLE 1	147
ANNEXES : ARTICLE 2	157
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degré Celcius

μM : micro molaire

4-AP : 4-Aminopyridine

5-HT : 5-Hydroxytryptamine ou Sérotonine

AA : Acide Arachidonique

AC : Adénylate cyclase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AHP : After HyperPolarization

AKAP150 : A Kinase Anchor Protein 150

A-MC : A-fiber Mechano-Cold sensitive

A-MH : A-fiber Mecano-Heat sensitive

AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARN : Acide RiboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ASIC: Acid-Sensing Ion Channel

ATP: Adénosine TriPhosphate

AUC : Area Under Curve (Aire sous la courbe)

BK : Big conductance calcium-activated potassium channels

BSA : Bovine Serum Albumine

Ca²⁺: calcium

CaCl₂ : chlorure de Calcium

Ca_v: canal calcique voltage-dépendant

C-C : C-fibers Cold sensitive

CCI : Chronique Constriction Injury (ligature du nerf sciatique)

CGRP : Calcitonin gene related peptide

C-H : C-fibers Heat sensitive

CHO : Chinese Hamster Ovary

C-HTM : C-fibers High Threshold Mechanoreceptors

C-MC : C-fiber Mechano-Cold sensitive

C-MH : C-fiber Mechano-Heat sensitive

C-MHC : C-fiber Mechano-Heat and Cold sensitive

COP1 : COat Protein 1

COS : Cercopithecus aethiops, Origin-defective SV-40

DAG : Diacylglycérol

DEG/ENac : Degerin/ Epithelial Na⁺ Channel

DRG : Ganglion de la Racine Dorsale

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GABA : Gamma Amino Butyric Acid

GNDF : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor

GIRK : G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ channel

GsMTx4 : Grammostola spatulata MechanoToxin 4

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCN : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel

HCR : High-threshold Cold Receptors

HEK : Human Embryonic Kidney

HEPES : acide

HydroxyEthylPiperazineEthaneSulfonique

HTM : High Threshold Mechanoreceptors

Hz : Hertz

I/V : courant/potentiel

IASP : International Association for the Study of Pain

IB4 : isolectine B4

ICV : IntraCérébroVentriculaire

IEM : érythromélagie

iGluR : Récepteurs ionotropiques du Glutamate

IK : Intermediate conductance calcium-activated potassium channels

IP3: Inositol triPhosphate

IT : intrathécal

IV : intraveineuse

K⁺: potassium

K_{2P} : canal potassique à 2 domaines P

K_{Ca} : canal potassique activé par le calcium

KCl : chlorure de potassium

KD : Knock-Down

K_{Na} : canal potassique activé par le sodium

KO : Knock-Out

K_v : canal potassique voltage dépendant

LCR : Low-threshold Cold Receptors

LPC : LysoPhosphatidylCholine

LTM : Low Threshold Mechanoreceptors

LTP : Long-Term Potentiation

mGluR : Récepteurs métabotropiques du Glutamate

MgSO₄ : sulfate de magnésium

min : minutes

mL : millilitre

Mtap2 : Microtubule-associated protein 2

MΩ : mega ohm

Na⁺: sodium

NaCl : chlorure de sodium

NaH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de sodium

Na_v : canal sodique dépendant du voltage

NGF : Nerve Growth Factor

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NS : Nociceptive-Specific

NSAIDs : Non-steroidal anti-inflammatory drugs

NTSR3 : Neurotensin Receptor 3

P2X : récepteur Purinergique ionotropique

pA : pico Ampère

PA : Potentiel d'Action

PC2 : PolyCystine 2

PEPD : Paroxysmal Extreme Pain Disorder

PGE2 : ProstaGlandine E2

pH : potentiel Hydrogène

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C	TM : domaine TransMembranaire
PLC : PhosphoLipase C	TRAAK : TWIK-Related Arachidonic Acid-activated K ⁺ channel
RA-LTM : Rapidly Adapting-Low Threshold Mechanoreceptors	TREK : TWIK-RElated K ⁺ channel
RCPG : RéCepteur aux Protéines G	TRESK : TWIK RELATED Spinal cord K ⁺ channel
RET : REarranged during Transfection	TrkA : Tropomyosin-related kinase A
s : seconde	TRP : Transient Receptor Potential
SA-LTM : Slowly Adapting-Low Threshold Mechanoreceptors	TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrin
SC : Sous-CSutané	TRPC : Transient Receptor Potential Canonical
SG : Substance Gélatineuse	TRPM : Transient Receptor Potential Melastin
SIF : Synthetic Interstitial Fluid	TRPML : Transient Receptor Potential MucoLipin
siRNA : small interfering RNA	TRPP : Transient Receptor Potential Polycystin
SK : Small conductance calcium-activated potassium channels	TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid
SNC : Système Nerveux Central	TTX : Tétródotoxine
SNP : Système Nerveux Périphérique	TWIK : Tandem of pore domain in a Weak Inward rectifying K ⁺ channel
SP : Substance P	WDR : Wide Dynamic Range
STOML3 : STOMatin-like protein 3	
SVF : Sérum de Veau Foetal	
TALK : TWIK related ALKaline pH-activated K ⁺ channel	
TASK : TWIK related Acid-Sensitive K ⁺ channel	
TEA : Tétraéthylammonium	
TG : Ganglion trijumeau	
THIK : Tandem pore domain Halothan Inhibited K ⁺ channel	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : L'HOMME DE DESCARTES.	11
FIGURE 2 : LES DIFFÉRENTES THÉORIES DE LA DOULEUR	13
FIGURE 3 : CANAUX IONIQUES ET NOCICEPTION	15
FIGURE 4 : LES DIFFÉRENTS MÉCANORÉCEPTEURS CUTANÉS.....	18
FIGURE 5 : CONNECTION ENTRE LES FIBRES AFFÉRENTES PRIMAIRES ET LA MOELLE ÉPINIÈRE.	24
FIGURE 6 : VOIES ASCENDANTES DE LA DOULEUR	26
FIGURE 7 : LES CANAUX IONIQUES CLÉS DANS LES VOIES DE LA DOULEUR	28
FIGURE 8 : LES CANAUX TRP	30
FIGURE 9 : DISTRIBUTION DES NEURONES EXPRIMANT LES CANAUX TRPV1, TRPM8 ET TRPA1.....	38
FIGURE 10 : PRINCIPAUX CANAUX TRP IMPLIQUÉS DANS LA PERCEPTION THERMIQUE	39
FIGURE 11 : PROPRIÉTÉS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES CANAUX ASIC.	41
FIGURE 12 : PROPRIÉTÉS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES CANAUX PIEZO.	44
FIGURE 13 : LES CANAUX POTASSIQUES À DEUX DOMAINES P (K_{2P})	52
FIGURE 14 : TREK-1 EST UN CANAL MÉCANOSENSIBLE.....	55
FIGURE 15 : TREK-1 EST UN CANAL THERMOSENSIBLE	56
FIGURE 16 : RÉGULATIONS ET PARTENAIRES PROTÉIQUES DU CANAL TREK-1.....	60
FIGURE 17 : IMPLICATION DU CANAL TREK-1 DANS LA PERCEPTION DOULOUREUSE.....	63
FIGURE 18 : TRAAK EST ACTIVÉ PAR LES ACIDES GRAS	65
FIGURE 19 : TRAAK EST UN CANAL MÉCANOSENSIBLE	66
FIGURE 20 : TRAAK EST UN CANAL THERMOSENSIBLE	67
FIGURE 21 : IMPLICATION DU CANAL TRAAK DANS LA PERCEPTION DU CHAUD	68
FIGURE 22 : IMPLICATION DES CANAUX TRAAK ET TREK-1 DANS LA PERCEPTION DU FROID.	69
FIGURE 23 : RÔLE DES CANAUX TREK-1 ET TRAAK DANS LA THERMO SENSIBILITÉ DES NOCICEPTEURS.	71
FIGURE 24 : TREK-2 EST UN CANAL MÉCANOSENSIBLE.....	74
FIGURE 25 : TREK-2 EST UN CANAL THERMOSENSIBLE	75
FIGURE 26 : COUPLAGE FONCTIONNEL ENTRE LE CANAL TREK-1 ET LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES μ OR ET Δ OR	84
FIGURE 27 : COUPLAGE FONCTIONNEL ENTRE LE CANAL TREK-2 ET LE RÉCEPTEUR μ OR	85
FIGURE 28 : ÉTUDE DE LA RÉPONSE CALCIQUE AU GLUTAMATE DES NEURONES DE MOELLE ÉPINIÈRE PAR IMAGERIE CALCIQUE	88
FIGURE 29 : EFFET DE LA MORPHINE SUR LA RÉPONSE CALCIQUE AU GLUTAMATE DES NEURONES DE MOELLE ÉPINIÈRE DE SOURIS.....	89
FIGURE 30 : ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ THERMIQUE DE NEURONES SENSORIELS DE DRG PAR IMAGERIE CALCIQUE.	90
FIGURE 31 : EFFET DE LA MORPHINE SUR LA THERMO SENSIBILITÉ DES NEURONES SENSORIELS DE DRG.....	92
FIGURE 32 : RÔLE DU CANAL TREK-1 DANS L'ANALGÉSIE THERMIQUE INDUITE PAR LA MORPHINE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	94

FIGURE 33 : RÔLE DU CANAL TREK-1 DANS L'ANALGÉSIE THERMIQUE INDUITE PAR LA MORPHINE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	95
FIGURE 34 : EFFET DE LA DÉLÉTION DU CANAL TREK-2 SUR LE POTENTIEL DE REPOS MEMBRANAIRE DES NEURONES SENSORIELS DE DRG	100
FIGURE 35 : SENSIBILITÉ AU CHAUD DES NEURONES SENSORIELS DE DRG TREK-2 ^{-/-}	102
FIGURE 36 : EXEMPLE D'ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITÉ D'UNE FIBRE C TREK-2 ^{-/-} EN RÉPONSE AU CHAUD.....	103
FIGURE 37 : ACTIVITÉ DES FIBRES C TREK-2 ^{-/-} EN RÉPONSE AU CHAUD	105
FIGURE 38 : EFFET DE LA DÉLÉTION DU CANAL TREK-2 SUR LA FRACTION DE FIBRES C SENSIBLES AU CHAUD.	106
FIGURE 39 : SENSIBILITÉ AU FROID DES NEURONES SENSORIELS DE DRG TREK-2 ^{-/-}	108
FIGURE 40 : EXEMPLE D'ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITÉ D'UNE FIBRE C TREK-2 ^{-/-} EN RÉPONSE AU FROID.	109
FIGURE 41 : ACTIVITÉ DES FIBRES C TREK-2 ^{-/-} EN RÉPONSE AU FROID.....	110
FIGURE 42 : EFFET DE LA DÉLÉTION DU CANAL TREK-2 SUR LA FRACTION DE FIBRES C SENSIBLES AU FROID.....	111
FIGURE 43 : SENSIBILITÉ AU CHAUD DES NEURONES SENSORIELS DE DRG TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-}	113
FIGURE 44 : ACTIVITÉ DES FIBRES C TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-} EN RÉPONSE AU CHAUD.....	114
FIGURE 45 : EFFET DE LA DÉLÉTION DES CANAUX TREK SUR LA FRACTION DE FIBRES C SENSIBLES AU CHAUD	115
FIGURE 46 : SENSIBILITÉ AU FROID DES NEURONES SENSORIELS DE DRG TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-}	116
FIGURE 47 : ACTIVITÉ DES FIBRES C TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-} EN RÉPONSE AU FROID.....	117
FIGURE 48 : EFFET DE LA DÉLÉTION DES CANAUX TREK SUR LA FRACTION DE FIBRES C SENSIBLES AU FROID.	118
FIGURE 49 : EFFET DE LA MORPHINE SUR L'ACTIVITÉ DES FIBRES C-MH SAUVAGES	120
FIGURE 50 : EFFET DE LA MORPHINE SUR L'ACTIVITÉ DES FIBRES C-MH TREK-2 ^{-/-}	121
FIGURE 51 : ALTÉRATION DE LA PERCEPTION AU CHAUD DES SOURIS TREK-2 ^{-/-} ET TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-} ..	125
FIGURE 52 : ALTÉRATION DE LA PERCEPTION AU FROID DES SOURIS TREK-2 ^{-/-} ET TREK-1 ^{-/-} -TREK-2 ^{-/-} -TRAAK ^{-/-} ...	127
FIGURE 53 : PRÉPARATION DE NERF-PEAU.	143

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I DOULEUR : GÉNÉRALITÉS ET PHYSIOLOGIE

A. Généralités

1. La douleur, un problème de santé publique

La douleur est une expérience universelle définie par l'« International Association for the Study of Pain » (IASP) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable en relation avec une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion ». La douleur est une sensation qui repose avant tout sur le ressenti et l'expérience personnelle de l'individu ce qui la rend difficile à qualifier et à quantifier. Elle en est d'autant plus complexe à étudier. La douleur, et particulièrement la douleur chronique, est une condition qui concerne environ deux tiers des consultations médicales chez le médecin généraliste et elle est un lourd fardeau économique (DRESS, 2008). Une étude réalisée dans le cadre de la Loi de Santé Publique 2004, (Serrie and Queneau, 2005) a montré que 57% des Français avaient été personnellement concernés par la douleur dans les deux années antérieures et que 28% étaient toujours en souffrance au moment de l'étude. Environ 20% de la population européenne souffre de douleurs chroniques, qui perdurent au moins 6 mois, et au sein de la population française ce pourcentage est d'environ 15% (Breivik et al., 2006). L'étude « National Health and Wellness Survey (NHWS) » rapporte que 17% des Français ont souffert de douleurs au cours du mois précédant, soit environ 8,6 millions de personnes (Mick et al., 2013). Parmi ceux-ci, 54% ont souffert de douleurs quotidiennes. Cette étude montre que les femmes et les personnes âgées, ainsi que les groupes socio-économiques les plus faibles sont plus particulièrement affectés. La majorité des douleurs sont des troubles musculo-squelettiques, principalement au niveau du rachis, et des troubles articulaires.

2. Historique

La douleur n'a pas eu la même signification à toutes les époques et dans toutes les civilisations. Le sens du mot douleur a reflété l'esprit contemporain de l'époque et a donc évolué au cours de l'histoire.

Dans les cultures archaïques, la douleur causée par une maladie, c'est-à-dire non associée à une blessure visible, était difficile à comprendre. Elle était mystifiée et on l'expliquait par la magie et par la présence d'un mauvais esprit dans le corps. Les Égyptiens considéraient l'expérience de la douleur comme l'acte d'un dieu ou d'un esprit affectant le cœur. En Grèce, Aristote (384-322 av.

J.C.) considérait le cœur comme le siège de la perception sensorielle, de l'âme et de toutes les fonctions fondamentales vitales et il associait la douleur à une émotion. Au cours de l'Antiquité un important concept a émergé, la théorie des humeurs, qui a perduré jusqu'au 19^e siècle. Décrit par des philosophes grecs vers 400 av. J.C., ce concept a été repris par Hippocrate de Cos (460-360) qui a défini les humeurs comme étant : le sang, la phlegme, la bile jaune et la bile noire. Chacune de ces humeurs correspondaient à l'un des quatre éléments et déterminaient les quatre tempéraments fondamentaux. Selon cette théorie, un déséquilibre des humeurs étaient la source des pathologies physiques et psychiques et donc la cause de la douleur (**Sabatowski et al., 2004**). Au cours du Moyen-âge, la progression de la Chrétienté a donné à la douleur un nouveau sens. Elle était expliquée comme quelque chose de spirituel, qui rapprochait de Dieu et que l'on soulageait par la prière et la méditation. La douleur est devenue un moyen de développement spirituel et était acceptée comme le lot de l'Humanité. Ce concept de douleur associée à un état mental a perduré longtemps et s'est d'autant plus développé avec l'apparition des théories freudiennes. Elles ont permis de soutenir la dimension psychologique sur la perception de la douleur et sur le comportement (**Sabatowski et al., 2004**).

À l'opposé des visions holistiques et philosophiques de la douleur, une approche mécanistique s'est développée, présentant le corps humain comme une machine et la maladie et la douleur comme des dysfonctionnements. Les prémices de cette vision se retrouvent durant l'Antiquité avec le médecin grec Claude Galien (130-201) puis plus tard, pendant le Moyen-âge avec le philosophe et médecin persan Avicenne (980-1037). Ces deux médecins ont conduit les premières études anatomiques et ont posé les premières bases de la douleur comme sensation physique plutôt que mentale. Galien a établi l'importance du système nerveux central. Il a reconnu le cerveau comme l'organe responsable de la sensibilité, au centre du système nerveux et connecté aux nerfs périphériques. Il a placé la douleur dans la sphère des sensations et a reconnu qu'elle était un signal d'alarme d'un changement important (interne ou externe) du corps humain (**Sabatowski et al., 2004**). Avicenne a été le premier à postuler que, dans la maladie, la douleur pouvait être dissociée de la perception du toucher et de la température, qu'elle était une sensation indépendante (**Rey, 2000**).

En 1664, René Descartes (1596-1650) va présenter la première théorie logique et mécanistique sur la physiologie sensorielle grâce à des études anatomiques directes. Dans sa 6^{ème} méditation métaphysique, il décrit la perception douloureuse comme un message passant par les nerfs et qui remonte par la moelle épinière jusqu'au cerveau où se reproduit une « image » du stimulus à l'esprit et lui fait ressentir la douleur (**Figure 1**). Cette théorie sera l'un des fondements des recherches menées pendant le 18^e et le 19^e siècle.



Figure 1 : L'Homme de Descartes. Représentation de la perception douloureuse par Descartes.

Magendie en 1822 démontre que la racine dorsale a une fonction sensorielle. En 1840, Joannes Müller avance l'idée, toujours d'actualité, de la spécificité des nerfs (Müller, 1840; Perl, 2007). Selon lui, la qualité des sensations ne dépend pas du stimulus mais de l'organe sensoriel et de la voie qui est stimulé. Les études de la fin du 18^e et du 19^e siècle ont permis de développer le concept de voies spécifiques et de récepteurs spécifiques à la douleur qui a donné lieu par la suite à différentes théories sur les relations entre les stimuli et la signalisation des afférences primaires.

Moritz Schiff proposa en 1858 la « Théorie de la Spécificité » (Figure 2A) selon laquelle douleur et sensation de toucher sont des modalités sensorielles différentes avec leur propre système nerveux périphérique et central. Cette théorie a été supportée par Blix, et von Frey (Perl, 2007). Wilhelm Herb, en 1874, énonce la « Théorie de l'Intensité » (Figure 2B). Selon lui, les décharges nerveuses produites par la douleur résultent d'une stimulation intense d'un récepteur non-spécifique, et donc chaque stimulus peut évoquer de la douleur s'il atteint une intensité suffisante. Alfred Goldscheider, en 1884, présente la « Théorie de la Sommation » qui énonce que l'activation nerveuse douloureuse est produite par la sommation d'informations sensorielles reçues par la peau et transmises vers la corne dorsale (Perl, 2007). Il montre que la peau a plus d'un seul type de sensibilité et qu'elle contient un certain nombre d'organes sensoriels différents. Il définit trois types d'activités sensorielles sur la peau (pression, chaud et froid) (Perl, 2007). En 1903, Charles Sherrington a proposé l'existence dans la peau de terminaisons nerveuses spécifiques pour détecter les stimuli nocifs (Sherrington, 1903). Sherrington définit un stimulus nocif comme un stimulus ayant une intensité suffisante pour déclencher un mouvement réflexe de retrait, une réponse automatique et de la douleur, le tout constituant une réaction

nociceptive. Il a également défini l'ensemble du système neuronal responsable de la détection de stimuli nocifs comme des nerfs nociceptifs et les nocicepteurs.

Mais la douleur est une interaction complexe entre les systèmes nerveux central et périphérique. La première théorie qui associa à la fois l'aspect mécanistique et l'aspect psychologique de la douleur fut celle introduite par Ronald Melzack et Patrick Wall en 1965, la « Théorie de la Porte » (ou gate control) (**Melzack and Wall, 1965**). D'après Melzack et Wall, la couche superficielle, substance gélatineuse (SG), de la moelle épinière a pour rôle de moduler la transmission synaptique de l'influx nerveux venant de la périphérie vers le système nerveux central, formant une porte d'accès au message nociceptif (**Figure 2D**). La « porte » serait modulée par des voies nerveuses descendantes influencées par les émotions, l'attention et la mémoire qui seraient ainsi capables de contrôler l'information sensorielle. La théorie de la porte est à ce jour la théorie la plus pertinente alliant les aspects physiques et psychologiques de la douleur.

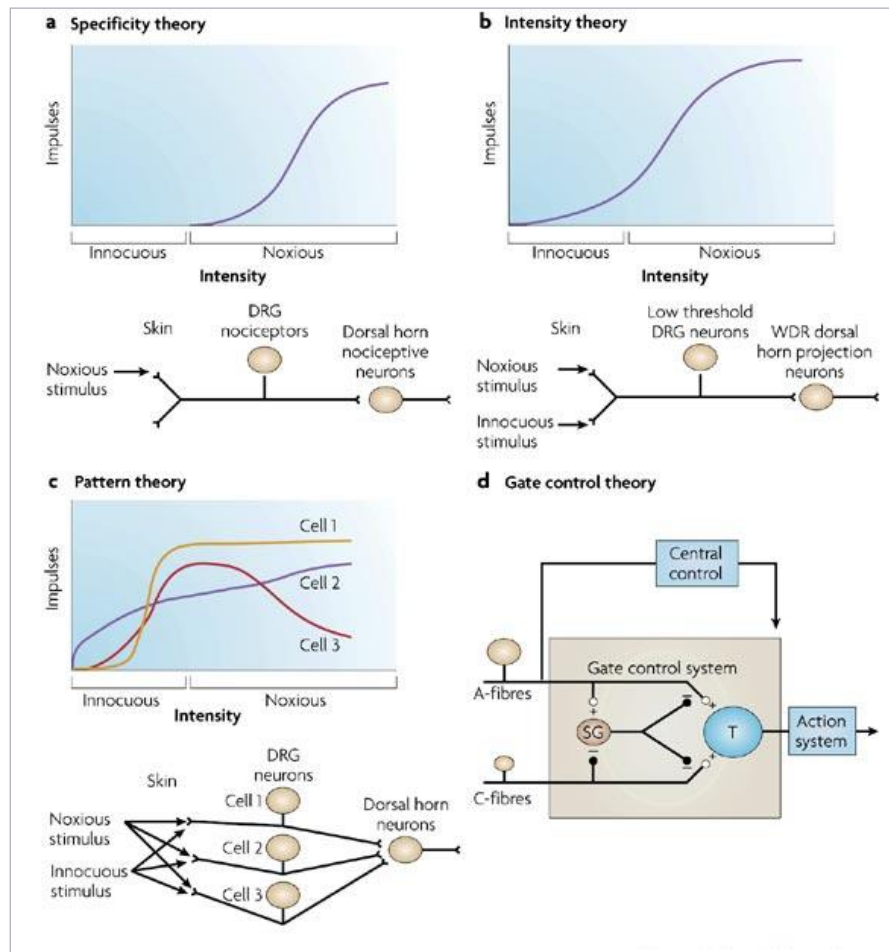


Figure 2 : Les différentes théories de la douleur. Diagrammes décrivant les théories classiques à propos des relations entre les stimuli et les fibres afférentes primaires dans les différentes théories de la douleur. **a. Théorie de la spécificité** : les nocicepteurs, organes sensoriels spécialisés, ont des seuils d'activation proche des seuils de douleur et dont l'activité augmente avec l'intensité du stimulus nocif. Ces fibres spécialisées forment des connexions sélectives avec des neurones de projection spécifiques de la moelle épinière et du tronc cérébral. **b. Théorie de l'intensité** : les organes sensoriels périphériques ne se différencient pas en fonction de leur seuil d'activation (haut seuil ou bas seuil). Cette théorie propose que les fibres périphériques transduisent les stimuli non douloureux en générant un certain niveau d'activité alors que les stimuli nocifs induisent un plus grand niveau d'activité. Ces fibres dont l'activité est codée par l'intensité du stimulus, activent ensuite des neurones WDR (cf Introduction partie 2). La faible activation des projections WDR correspond à un stimulus non douloureux ; une forte activation indique un événement douloureux. **c. Théorie du pattern** : cette théorie propose que les organes sensoriels somatiques ont une large gamme de réponse. Les neurones afférents répondent individuellement aux stimuli avec différentes relations à l'intensité. Le mode et le lieu de l'activation sont définis par le pattern d'activité des populations de fibres d'une certaine région du corps. Les neurones de moelle codent la nature et la localisation de la stimulation en fonction du pattern d'activation et de la distribution des fibres afférentes. **d. Théorie du Gate Control** : d'après cette théorie, les fibres afférentes primaires ont une large gamme de seuils d'activation et il n'existe pas de nocicepteurs spécifiques ni de voies centrales spécialisées. Les fibres A, de large diamètre, s'adaptent plus rapidement à une stimulation prolongée que les fibres de petit diamètre (fibres C). Une « porte » présynaptique dans la substance gélatineuse de la corne dorsale de la moelle (SG), entre les fibres afférentes primaires et les neurones de projection, est contrôlée par la balance d'activité entre les fibres A et C. Un contrôle descendant, issu du SNC, serait responsable de la modulation de la porte. *DRG, Dorsal Root Ganglion (ganglion spinal) ; T, neurones de transmission.* (D'après Perl et al. 2007).

B. Anatomie de la douleur

Les nocicepteurs répondent sélectivement aux stimuli grâce à une spécialisation morphologique et moléculaire. L'information sensorielle est ensuite acheminée vers les centres supra-spinaux pour y être intégré comme message douloureux en faisant relai dans la moelle épinière.

1. Périphérie

Le signal nociceptif prend naissance au niveau des nocicepteurs situés à l'extrémité des fibres nerveuses nociceptives situés dans la peau, les viscères, les articulations et les muscles. Les nocicepteurs sont les premiers récepteurs du système somatosensoriel. La morphologie de ces terminaisons sensorielles est hautement conservée chez l'animal, du rongeur à l'homme, la majorité des propriétés électrophysiologiques étant comparables entre le rat, le chat, le primate et l'homme (Andrew and Greenspan, 1999). Ils sont essentiels pour la transduction de stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques de forte intensité en signaux électriques, pour le codage des signaux électriques en potentiel d'action et la phase initiale de la transmission de ces signaux vers le système nerveux central (Figure 3). Les corps cellulaires des neurones nociceptifs se trouvent dans les ganglions rachidiens pour l'innervation du corps et des viscères et dans les ganglions trijumeaux pour l'innervation du crâne et de la face. Les neurones des ganglions rachidiens sont des cellules de type pseudo-unipolaires. Ils présentent une branche axonale qui est divisée en deux collatérales, l'une se projetant en périphérie et l'autre vers le système nerveux central. La branche centrale entre dans la corne dorsale de la moelle épinière où elle forme la première synapse des voies somatosensorielles sur des neurones de second ordre.

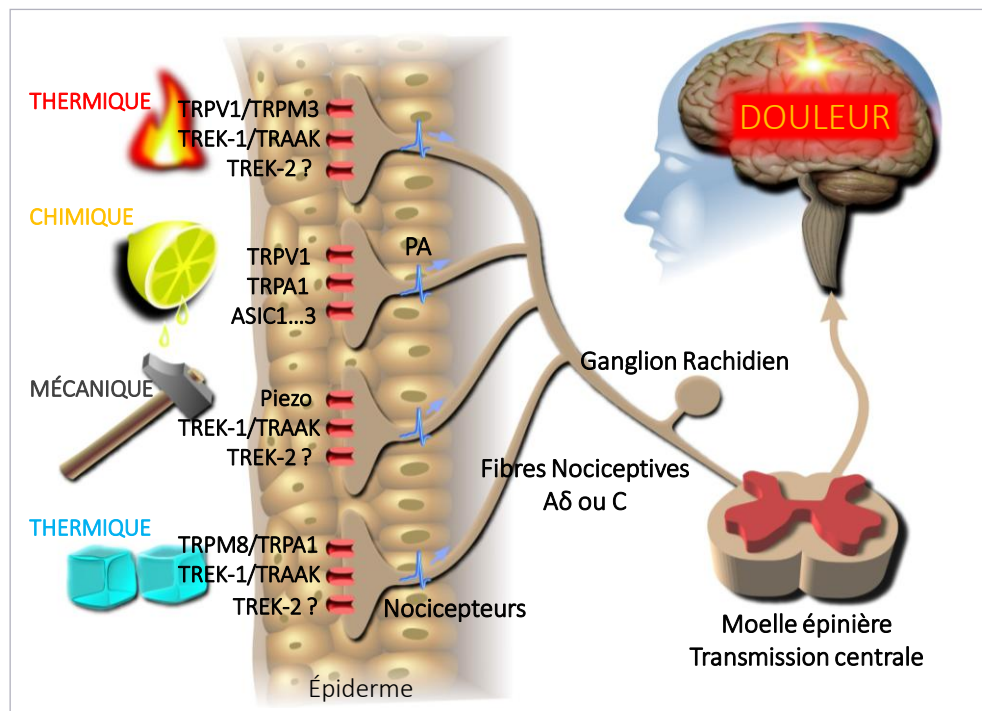


Figure 3 : Canaux ioniques et nociception. Les stimuli thermiques, chimiques et mécaniques sont détectés par différents canaux ioniques exprimés dans les nocicepteurs comme les canaux TRP, les canaux TREK ou encore les canaux ASIC. Ces canaux sont les senseurs primaires qui confèrent une sensibilité thermique, mécanique ou chimique aux nocicepteurs. Il existe deux types de fibres nerveuses nociceptives, les Aδ et les C. Le corps cellulaire des nocicepteurs se trouvent dans les ganglions sensoriels. Le message nerveux est envoyé vers le cortex où il est intégré comme message douloureux. *TREK*, *TWIK RElated K⁺ channels*; *TRP*, *Transient Receptor Potential*; *ASIC*, *Acid-Sensing Ion Channel*.

a. Classification fibres afférentes

Les fibres sensorielles sont classifiées selon différents critères, morphologiques (diamètre, myélinisées ou pas), fonctionnels (vitesse de conduction, seuil d'activation) ou en se basant sur l'expression de marqueurs moléculaires. Il existe deux classifications principales des fibres afférentes. L'une, celle de Erlanger et Gasser (**Gasser, 1941**) prend en compte à la fois les fibres afférentes et efférentes et utilise les lettres A, B et C tandis que celle de Lloyd et Hunt (**Kandel and Schwartz, 2013**), qui ne se réfère qu'aux fibres afférentes, utilise les nombres I, II, III et IV. Il n'existe pas de correspondance exacte entre ces deux classifications et il est donc difficile de les regrouper. Classiquement, c'est la classification d'Erlanger et Gasser qui est utilisée. La classification de Lloyd et Hunt est encore utilisée pour décrire les fibres sensorielles qui innervent les muscles.

Les fibres A sont de plus gros diamètre et myélinisées et, en conséquence, présentent la vitesse de conduction la plus grande. Elles sont subdivisées en quatre groupes : α, β, δ et γ. Les fibres de type Aα innervent les muscles squelettiques. Les fibres Aβ possèdent une importante gaine de myéline (entre 6 et 12μm de diamètre) et conduisent très rapidement l'influx nerveux (30 à 70 m.s⁻¹). Elles sont responsables des sensations tactiles, ou proprioceptives pour les fibres

provenant des fuseaux neuromusculaires et des organes tendineux de Golgi. Elles transmettent l'information de récepteurs tactiles cutanés : les corpuscules de Meissner et de Pacini et des follicules pileux. Les fibres A γ sont purement motrices, ce sont des motoneurons de la corne ventrale de la moelle épinière et permettent la contraction des muscles squelettiques. Les fibres de type A δ sont plus faiblement myélinisées et de plus petit diamètre (1-5 μ m). Elles conduisent l'influx nerveux à une vitesse moyenne, entre 2 et 30 m.s⁻¹. Elles permettent la perception de la pression et de la température au niveau cutané et sont également impliquées dans la nociception mécanique et thermique, froid notamment.

Les fibres de type B sont elles aussi des fibres faiblement myélinisées dont le diamètre est compris entre 1 et 3 μ m. Contrairement aux fibres A et C, ces fibres sont exclusivement efférentes et appartiennent au système nerveux autonome dont elles constituent les fibres pré ganglionnaires.

Les fibres de type C sont les plus nombreuses. Elles représentent environ 80% des afférences cutanées et la quasi-totalité des afférences viscérales. Ce sont des fibres non myélinisées, dont le diamètre est compris entre 0,3 et 1,5 μ m et qui conduisent l'influx nerveux lentement, entre 0,4 et 2m.s⁻¹. La grande majorité d'entre elles sont des fibres nociceptives mais environ 20% sont des fibres sympathiques post ganglionnaires du système nerveux autonome. (Guirimand and Le Bars, 1996; Julius and Basbaum, 2001; Kandel and Schwartz, 2013)

Type de fibre	Diamètre (μ m)	Myéline	Vitesse de conduction (m.s ⁻¹)	Fonction
A α	12-20	Oui	80-120	Sensibilité proprioceptive inconsciente
A β	6-12	Oui	30-70	Sensibilité tactile Sensibilité proprioceptive consciente (positions)
A δ	1-5	Faible	2-30	Sensibilité thermique (températures non nocives)
C	0,3-1,5	Non	0,4-2	Sensibilité douloureuse Sensibilité thermique (températures non nocives) Sensibilité au prurit Sensibilité toucher

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes fibres afférentes primaires. D'après Guirimand and le Bars, 1996, Julius and Basbaum, 2001 ; Kandel and Schwartz, 2013.

On peut aussi classer les fibres afférentes en fonction de leur sensibilité à différents stimuli. On distingue les mécanorécepteurs, les thermorécepteurs et les chémorécepteurs. Les nocicepteurs présentent la particularité d'être, pour leur grande majorité, des récepteurs polymodaux capables de détecter différents types de stimuli.

b. Mécanorécepteurs

Les mécanorécepteurs sont distribués partout dans la peau, les tendons, les muscles, les articulations et les viscères. Il existe deux types de mécanorécepteurs, les propriocepteurs et les mécanorécepteurs cutanés. Les propriocepteurs sont sensibles à la position des articulations, aux tensions des tendons et ligaments et à la contraction musculaire. Nous ne traiterons pas des propriocepteurs et nous nous intéresserons plus particulièrement aux mécanorécepteurs cutanés.

Grâce à une grande diversité des structures sensorielles, les mécanorécepteurs cutanés sont capables de détecter une large gamme de stimuli mécaniques allant du toucher et des vibrations à la pression douloureuse (**Figure 4**). On distingue deux types de fibres afférentes sensibles à la pression mécanique : les fibres à bas seuil de sensibilité (Low Threshold Mechanoreceptors, LTMs) qui sont sensibles à de faibles pressions (de l'ordre du toucher) et les fibres à haut seuil de sensibilité ou HTMs (High Threshold Mechanoreceptors) qui sont impliquées dans la détection de pressions douloureuses.

Il existe quatre types de LTMs dans la peau glabre qui détectent chacune un type de stimulus mécanique : les corpuscules de Pacini, corpuscule de Meissner et corpuscule de Ruffini et les disques de Merkel (**Figure 4**). Les disques de Merkel et les corpuscules de Meissner sont localisés près de la surface de la peau, à l'interface du derme et de l'épiderme, et présentent un champ récepteur petit et localisé qui va leur permettre de détecter des textures et des formes. A l'inverse, le champ récepteur des corpuscules de Pacini et de Ruffini, qui se situent plus profond dans le derme, sont plus étendus et ils peuvent être sensibles à des vibrations ou à une déformation de la peau (**Delmas et al., 2011; McGlone and Reilly, 2010**). On peut classer les LTMs grâce à leurs propriétés électrophysiologiques en deux classes. Les corpuscules de Meissner et de Pacini sont des LTMs dits à adaptation rapide (RA-LTMs) c'est-à-dire qu'ils déchargent des potentiels d'action phasiques au début et à la fin du contact, en restant généralement silencieux pendant le stimulus. Les disques de Merkel et les corpuscules de Ruffini sont des LTMs à adaptation lente (SA-LTMs) qui vont décharger tout au long de la stimulation, décharge tonique. Dans la peau poilue, on retrouve d'autres types de LTMs, les récepteurs des follicules pileux, qui détectent le toucher (**Iggo and Andres, 1982**). Ils sont à adaptation rapide et sont divisés en deux types : le follicule de type D qui est associé à des fibres A δ et le follicule G, associé à des fibres A β (**Brown and Iggo, 1967**). En plus de ces LTMs associés à des structures complexes, il a également été décrit des afférences libres de type C-LTMs qui seraient responsables de la détection de stimulations légères et plaisantes comme la caresse (**Iggo and Kornhuber, 1977; Löken et al., 2009**).

Les récepteurs de type HTM sont quant à eux sensibles à des pressions douloureuses. Ce sont des terminaisons libres de type A δ et C qui ne sont pas associées à des structures auxiliaires.

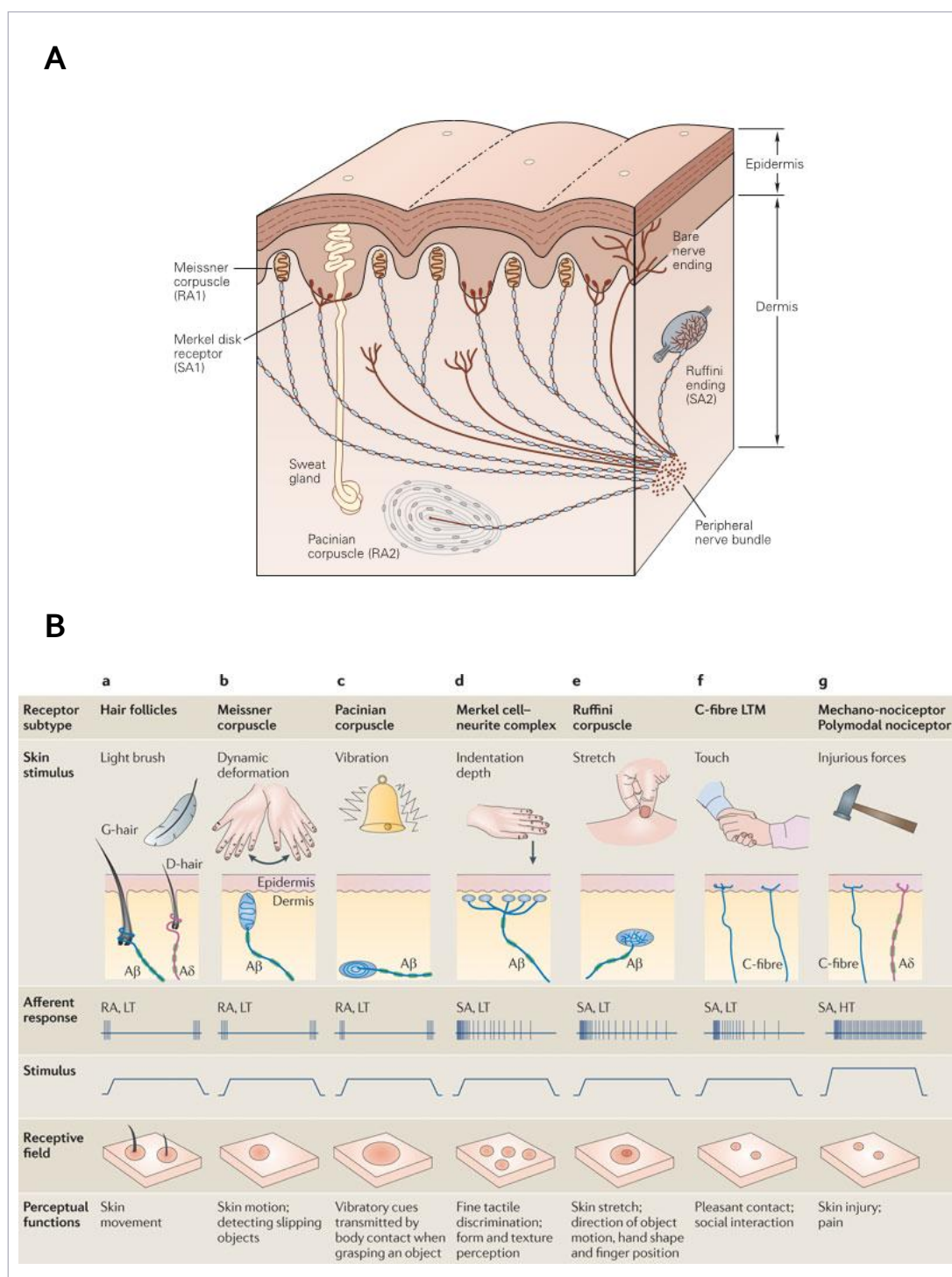


Figure 4 : Les différents mécanorécepteurs cutanés. A.Organisation des mécanorécepteurs responsables de la sensibilité tactile dans la peau. Coupe schématique de la peau glabre montrant les principaux récepteurs du toucher. D'après Kandel and Schwartz, 2013. B. Tableau récapitulatif des caractéristiques des mécanorécepteurs retrouvés dans la peau glabre. RA, (rapidly adapting) adaptation rapide ; LT, (low threshold) bas seuil ; SA (slowly adapting) adaptation lente ; HT (high-threshold) haut seuil. D'après Delmas et al., 2011.

c. Thermorécepteurs

La perception thermique est l'une des modalités sensorielles de la peau. D'infimes variations de températures peuvent être perçues par la peau. Elle permet la thermorégulation de l'organisme, la détection de stimuli thermiques qui pourraient potentiellement être nocifs et contribue à l'identification d'objets au travers du toucher (Schepers and Ringkamp, 2009). Les stimuli thermiques peuvent produire différentes sensations. Ces sensations résultent des différences perçues entre la température externe de l'air ou des objets en contact avec le corps et la température normale de la peau soit environ 32°C (Kandel and Schwartz, 2013). La thermo sensation cutanée est médiée par une variété de fibres nerveuses afférentes. On en distingue six types différents : les récepteurs au froid à haut et bas seuil de sensibilité, les récepteurs au chaud modéré (tiède) et deux classes de récepteurs au chaud nocif.

> Récepteurs au froid

Différentes études ont montré que 10 à 15 % de neurones de ganglions spinaux ou trijumeaux répondent à des températures entre 35 et 5°C (Babes et al., 2004; Madrid et al., 2009; Reid and Flonta, 2001; Suto and Gotoh, 1999). Deux groupes distincts de neurones sont sensibles au froid : les neurones sensibles au froid modéré (Low-threshold Cold Receptors, LCRs) et les neurones sensibles au froid plus extrême, nocif, les High-threshold Cold Receptors (HTCs) (Babes et al., 2004; Madrid et al., 2009).

Les fibres afférentes sensibles au froid de type LCR ont été identifiées par des études d'électrophysiologie *in vitro* dans différentes espèces (Darian-Smith et al., 1973; Dubner et al., 1975; Kenshalo and Duclaux, 1977). La vitesse de conduction de ces fibres varie entre 9 et 15 m.s⁻¹ ce qui suggère que ce sont des fibres faiblement myélinisées de type A δ . Ce sont des fibres afférentes libres qui projettent directement dans l'épiderme (Dhaka et al., 2008). Leur pic d'activité se situe entre 20°C et 30°C mais elles sont capables de détecter une large gamme de température (entre 17°C et 40°C) (Schepers and Ringkamp, 2009). Elles présentent souvent une activité spontanée modérée à la température normale de la peau (environ 32°C). Lors d'un refroidissement, correspondant à un changement négatif de la température, elles présentent une forte activité qui se stabilise en plateau en même temps que la température. Leur activité est inhibée lorsque la température augmente. Ces fibres sont insensibles aux stimuli mécaniques. On a pu identifier chez l'Homme des fibres présentant les mêmes caractéristiques (Campero et al., 2001).

Les fibres de type HCR sont sensibles à des températures inférieures à 27°C. Elles ne sont pas sensibles aux stimuli mécaniques ou au chaud. Leur vitesse de conduction lente nous permet de dire que ce sont des fibres de type A δ et C (LaMotte and Thalhammer, 1982). Contrairement aux LCRs, elles n'ont pas d'activité spontanée à la température normale de la peau. Elles s'adaptent rapidement et ne répondent plus à des températures stables entre 20 et 30°C soit les températures où les fibres LCRs ont une activité maximale et maintenue (Schepers and Ringkamp, 2009).

Les fibres C mécanosensibles à bas seuil (C LTM) sont activées par un refroidissement rapide de la peau (Li et al., 2011). Ces fibres ne sont activées que par un refroidissement de la peau plus rapide que $2^{\circ}\text{C}.\text{s}^{-1}$. Leur réponse est transitoire et se désensibilisent rapidement car elles ne sont pas activées par des températures stables. Ces fibres sont insensibles aux températures élevées et répondent fortement au toucher léger. L'intensité de leur réponse au froid est nettement inférieure à celle induite par une stimulation mécanique. Il est donc peu probable que ces fibres participent à la perception du froid (Li et al., 2011).

> Récepteurs au chaud

Les fibres sensibles au chaud, tout comme celles activées par le froid, présentent un champ récepteur restreint et sont insensibles aux stimuli mécaniques. Ce sont des fibres de type C, qui conduisent l'influx nerveux à $1\text{m}.\text{s}^{-1}$ en moyenne (Darian-Smith et al., 1979; LaMotte and Campbell, 1978). Il a d'ailleurs été montré que si l'on bloque les fibres C on abolit la perception du chaud modéré (Mackenzie et al., 1975). Ces fibres présentent une activité spontanée à la température de la peau qui disparaît lors d'un refroidissement. Ces fibres répondent fortement à une augmentation dynamique de la température et, comme les fibres sensibles au froid, vont présenter une forte activité au début du stimulus puis rapidement s'adapter et se stabiliser en même temps que la température (Duclaux and Kenshalo, 1980). Leur activité est maximale entre 40 et 43°C et diminue autour de 50°C (Darian-Smith et al., 1979; Duclaux and Kenshalo, 1980; LaMotte and Campbell, 1978).

d. Nocicepteurs

Les fibres nociceptives ont un haut seuil d'activation et sont sensibles à différents stimuli, thermique, mécanique et/ou chimique de forte intensité. On distingue des fibres de type A δ , faiblement myélinisées et de conduction rapide de l'influx nerveux, et des fibres de type C, non myélinisées et dont la vitesse de conduction est plutôt lente. Cela signifie que les signaux conduits par des fibres A δ arrivent à la moelle épinière avant les messages portés par les fibres C. Lors d'une douleur, on ressent deux phases distinctes : la première est rapide, courte et bien localisée et elle est suivie d'une douleur plus profonde et plus étendue. De par leurs propriétés électrophysiologiques, les fibres A δ seraient responsables de la douleur immédiate et les fibres C de la douleur plus lente et plus étendue.

> Les fibres A δ nociceptives

Ces fibres sont distinguées en fonction de leur sensibilité aux stimuli mécaniques et thermiques. La majorité des fibres nociceptives A δ sont des fibres polymodales A-MH (A-fiber Mecano-Heat sensitive), c'est-à-dire activées à la fois par le chaud et par la pression mécanique. Elles représentent 86% des nocicepteurs de type A (Djouhri and Lawson, 2004). Les fibres A-MH de type I répondent préférentiellement à une stimulation mécanique et présentent un seuil de sensibilité thermique très élevé ($>53^{\circ}\text{C}$). Les fibres A-MH de type II sont plus sensibles aux

augmentations de température avec un seuil thermique avoisinant 47°C (Treede et al., 1995). Les fibres A-MH de type II ne sont pas présentes dans la peau glabre ce qui expliquerait l'absence de douleur thermique rapide lors d'une stimulation douloureuse d'intensité modérée (<~53°C) sur ce type de peau. Les fibres A-MH sont des fibres de type A δ même si certaines fibres ont une vitesse de conduction se rapprochant de celle de fibres de type A β et pourraient être considérées comme telles (Djoughri and Lawson, 2004).

Une sous population de fibres A δ mécanosensibles sont activées par le froid nocif, les fibres A-MC (A-fiber Mechano-Cold sensitive) dont le seuil de sensibilité au froid peut être inférieur à 0°C (Djoughri and Lawson, 2004; Simone and Kajander, 1996).

> Les fibres C nociceptives

La majorité des fibres C nociceptives sont polymodales, les fibres C-MH (C-fiber Mechano-Heat sensitive). Ces fibres sont sensibles aux changements de température et à la pression mécanique. L'étude par microneurographie de la répartition des fibres C chez l'Homme a montré que la majorité des fibres C sont des C-MH (45%) (Schmidt et al., 1995). Leur seuil d'activation au chaud se situe aux alentours de 40°C (Tillman et al., 1995).

Certaines fibres C polymodales sont sensibles aux stimulations mécaniques et au refroidissement, les fibres de type C-MC (C-fiber Mechano-Cold sensitive), qui représentent environ 17% des fibres C cutanées (Noël et al., 2009), et des fibres également sensibles au chaud, les fibres C-MHC (C-fiber Mechano-Heat and Cold sensitive) également appelées nocicepteurs au froid multimodaux (Zimmermann et al., 2009) qui constituent 24% des fibres (Noël et al., 2009). Certaines fibres C sont sensibles uniquement au chaud (C-fibers Heat, C-H), ou uniquement au froid (C-fibers Cold, C-C) ou encore sont spécialisées dans la perception mécanique douloureuse, les C-HTM (High Threshold Mechanoreceptors) (Schmidt et al., 1995; Zimmermann et al., 2009). Certains nocicepteurs de type C sont également spécialisés dans la réponse aux agents chimiques purinogènes endogènes comme l'histamine et la bradykinine. Ces fibres seraient responsables de la transmission des sensations de démangeaison (Schmelz et al., 1997).

Enfin, des fibres C dites silencieuses sont également présentes dans la peau de différents mammifères, cobaye (Djoughri et al., 1998), singe (Meyer et al., 1991), homme (Schmidt et al., 1995). Ces fibres présentent une vitesse de conduction similaire aux autres fibres C-MH mais ont un seuil d'excitabilité beaucoup plus élevé en conditions physiologiques. Le seuil de sensibilité est diminué par les molécules algogènes ou des conditions inflammatoires et les fibres sont alors très sensibles aux stimuli mécaniques (Schmidt et al., 1995).

Deux sous populations différentes de fibres C sont reconnues par l'expression sélective de récepteurs membranaires (Julius and Basbaum, 2001).

Environ 50% des nocicepteurs de type C, les fibres C peptidergiques, ainsi que ~20% des fibres A δ , expriment deux neuropeptides : la substance P et le Peptide Relié au Gène Calcitonine (CGRP, Calcitonin-Gen Related Peptide). La SP et CGRP sont des neuromédiateurs largement colibérés.

40% des neurones des DRG expriment la SP et le CGRP (Djoughri and Lawson, 2004). Ces fibres expriment également le récepteur TrkA (Tropomyosin-related kinase A), un récepteur de type Tyrosine-Kinase au facteur de croissance nerveux (Nerve Growth Factor, NGF) (Basbaum et al., 2009).

Une seconde population de fibres C nociceptives, les fibres C nociceptives non peptidergiques, n'exprime ni les peptides CGRP et substance P ni TrkA mais présente une forte affinité pour l'isoelectine B4 (IB4) (Gerke and Plenderleith, 2001). Aucun neurone sensoriel à bas seuil n'exprime de récepteur pour cette lectine.

La sous-population de nocicepteurs IB4-positifs exprime le récepteur c-RET (Rearranged during Transfection) qui est le récepteur de la neurotrophine GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) et de différentes neurotrophines de la famille du GDNF (neurturine, artémine) (Basbaum et al., 2009). Les neurones IB4-positifs expriment également des récepteurs purinergiques comme P2X3.

Les nocicepteurs se différencient par l'expression de différents types de canaux ioniques transducteur de stimuli nocifs qui vont leur conférer leurs différentes sensibilités. Nous étudieront plus précisément cet aspect dans la deuxième partie de l'introduction.

2. Mécanismes spinaux de la nociception

a. *Projections centrales des nocicepteurs*

Selon leurs modalités sensorielles les fibres afférentes primaires se projettent dans des zones bien distinctes de la corne dorsale de la moelle épinière. La substance grise de la moelle épinière, qui couvre les cornes dorsale et ventrale, est organisée en XI lamina différenciées selon l'organisation topologique des neurones et leur fonction dans le traitement de l'information sensorielle (Dubner and Bennett, 1983; Rexed, 1952) (Figure 5).

Les neurones de la couche la plus superficielle de la corne dorsale, la lamina I, répondent aux stimuli nociceptifs transmis par les fibres A δ et C peptidergiques. Ces neurones de second ordre sont Nociceptive-Specific (NS). Dans la lamina I se situent également deux autres types de neurones de second ordre : des neurones qui reçoivent uniquement les afférences activées par le froid nocif (neurones thermosensibles) et une classe particulière de neurones qui répondent à la fois aux afférences mécanosensibles de type LTM ou HTM et donc à des signaux nocifs ou pas. Ces neurones sont appelés WDR pour Wide Dynamic-Range (Basbaum et al., 2009; Kandel and Schwartz, 2013).

La lamina II, ou substance gélatineuse, contient de nombreux interneurones qui peuvent être excitateurs ou inhibiteurs. Certains d'entre eux répondent de façon sélective à des informations de type nociceptives tandis que d'autres ne répondent qu'à des stimuli non nocifs. Dans la partie la plus externe de la lamina II, on retrouve des projections de fibres C peptidergiques et de fibres A δ , alors que dans la partie interne, ce sont principalement des

afférences de type C non peptidergiques qui viennent se projeter (Basbaum et al., 2009; Kandel and Schwartz, 2013). La partie la plus ventrale de la lamina II est caractérisée par la présence d'interneurones excitateurs qui expriment la Protéine Kinase C γ (PKC γ). Ces interneurones sont principalement le relai de fibres afférentes non nociceptives de type A β (Neumann et al., 2008).

Les laminae III et IV contiennent des interneurones et des neurones de projection vers les centres supra spinaux. La majorité de ces neurones reçoivent des afférences de type A β impliquées dans le toucher.

La lamina V contient des neurones de second ordre qui répondent à une large gamme de stimuli nocifs et projettent vers le tronc cérébral et le thalamus. Ces neurones sont de type WDR et reçoivent des projections directes des fibres A β et A δ mais également de fibres C nociceptives car les dendrites de ces neurones projettent jusque dans la lamina II. Les neurones de la lamina V reçoivent également des projections de nocicepteurs viscéraux (Basbaum et al., 2009; Kandel and Schwartz, 2013).

La lamina VI reçoit majoritairement les projections de fibres à gros diamètre qui innervent les muscles et les articulations. Les neurones de cette lamina sont activés par les mouvements articulaires non douloureux et ne contribuent pas à la transmission de l'information nociceptive. La lamina VII est la couche intermédiaire, les laminae VIII et IX forment la corne ventrale dans laquelle se trouvent les corps cellulaires des motoneurones dont les axones, les efférences motrices, vont sortir par la racine ventrale pour innervier les muscles squelettiques. Dans la corne ventrale, des projections de propriocepteurs de type A α et A β peuvent établir un contact direct avec un motoneurone pour déclencher des réflexes myotatiques. Même s'ils sont majoritairement activés par des afférences non nocives, les neurones des laminae VII à X reçoivent également des afférences de nocicepteurs A δ et C innervant muscle et viscères (Kandel and Schwartz, 2013).

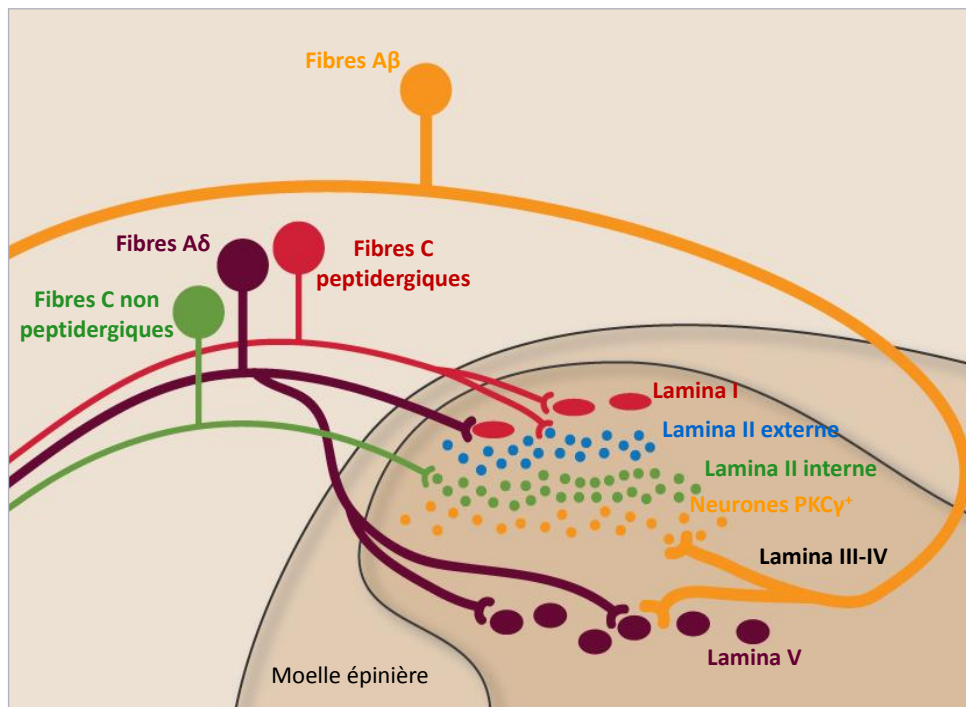


Figure 5 : Connexion entre les fibres afférentes primaires et la moelle épinière. Il y a une organisation très précise en laminae dans la corne dorsale de la moelle épinière. Des sous-populations de fibres afférentes primaires ciblent des neurones dans ces différentes laminae. Les fibres non myélinisées de type C peptidergiques (rouge) et les nocicepteurs myélinisés Aδ (violet) font synapse dans les couches les plus superficielles avec les neurones de projection de gros diamètre (rouge) de la lamina I et des interneurones (bleu) de la lamina II externe. Les nocicepteurs non myélinisés et non peptidergiques (vert) projettent sur des interneurones dans la lamina II interne (vert). À l'inverse, les stimuli non nocifs sont transmis par les fibres myélinisées Aβ (orange) qui projettent sur des interneurones exprimant PKCγ dans la partie ventrale de la lamina II. Une seconde population de neurones de projection, située dans la lamina V (violet), reçoit les projections de fibres de type Aβ et Aδ. D'après Basbaum et al., 2009.

b. Modulation spinale de la nociception

Les neurones nocicepteurs qui activent des neurones de second ordre dans la corne dorsale libèrent principalement deux classes de neurotransmetteurs : le glutamate et des neuropeptides comme la substance P et le CGRP. Ils sont responsables respectivement de la transmission synaptique rapide et lente (Dubin and Patapoutian, 2010). Le glutamate est le neurotransmetteur principal des neurones sensoriels primaires, quel que soit leur type de sensibilité, et les neuropeptides sont libérés comme des co-neuromédiateurs par de nombreux nocicepteurs non myélinisés. Ces deux types de neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules différentes ce qui permet leur libération dans des conditions physiologiques différentes (Kandel and Schwartz, 2013). La substance P est libérée par les terminaisons centrales des nocicepteurs en cas de stimulation intense des nerfs périphériques et son interaction avec les récepteurs aux neurokinines dans les neurones de la corne dorsale peut prolonger la dépolarisation induite par le glutamate.

Cela signifie que malgré des actions physiologiques différentes, les neuropeptides et le glutamate peuvent réguler de façon coordonnée l'excitabilité des neurones de la corne dorsale (Kandel and Schwartz, 2013).

Les neurones de second ordre de la corne dorsale sont également impliqués dans un phénomène de sensibilisation par stimulation répétées qu'on appelle Wind-up, qui implique une activation maintenue des neurones par la mise en place d'une potentialisation à long terme ou LTP (Long-Term Potentiation), ce qui va exacerber la douleur ressentie (Dubin and Patapoutian, 2010)

Enfin, l'activité des neurones de la corne dorsale peut également être modulée au niveau spinal par des afférences de centres supra-spinaux ou périphériques. C'est ce qu'on appelle la théorie du Gate Control (Melzack and Wall, 1965), qui propose que les neurones de la corne dorsale sont sous la dépendance d'influences excitatrices mais aussi d'influences inhibitrices. Les premières sont essentiellement périphériques mais les secondes sont à la fois périphériques et supra-spinales. D'après cette théorie les neurones recevant les projections des fibres tactiles et nociceptives, les WDR, peuvent être inhibés par des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Cela explique par exemple que la sensation de douleur s'estompe lorsque la zone blessée est stimulée par un stimulus non douloureux comme une caresse ou un frottement (Guirimand and Le Bars, 1996; Kandel and Schwartz, 2013).

Les neurones de la corne dorsale sont donc le relai de l'information sensorielle mais ils sont aussi capables d'être modulés positivement ou négativement par différents processus, ce qui fait de la moelle un lieu important de la modulation du message douloureux.

3. Voies ascendantes et traitement supra-spinal de la nociception

Les projections vers des neurones de second ordre dans les laminae I et V constituent la majeure partie de l'influx nociceptif dans la moelle épinière. Ces neurones sont à l'origine de plusieurs voies ascendantes vers les centres supra-spinaux qui intègrent le message douloureux. Les neurones de la corne dorsale projettent principalement vers trois sites : le thalamus, la formation réticulée et le mésencéphale (Guirimand and Le Bars, 1996), formant ainsi les faisceaux spinothalamique, spinoréticulaire et spinomésencéphalique (Figure 6).

Le faisceau spinothalamique et la voie nociceptive ascendante dominante dans la moelle épinière. Il inclut des axones de neurones NS thermosensibles et WDR des laminae I et V de la corne dorsale. Ces axones forment un décussation au niveau de leur segment d'origine et remontent par la substance blanche du quadrant antérolatéral avant de projeter dans les noyaux du thalamus. Un troisième neurone relai projette dans le cortex somesthésique. Cette voie intervient dans la composante sensori-discriminative de la douleur.

Le faisceau spinoréticulaire contient les axones de neurones des laminae VII et VIII. Ces axones circulent eux aussi dans le quadrant antérolatéral pour se projeter d'une part vers la formation réticulée, dans le tronc cérébral, et vers le thalamus. Ce faisceau permet l'élaboration de réponses physiologiques, de réflexes, à la douleur.

Le faisceau spinomésencéphalique, ou spinoparabrachial, contient les axones de neurones des laminae I et V, qui projettent dans le quadrant antérolatéral vers la substance grise périaqueducale et le noyau parabrachial du tronc cérébral. Un neurone de troisième ordre va ensuite activer les régions cérébrales du cortex limbique impliquées dans la gestion des émotions et la mémoire (cortex insulaire, amygdale...) ce qui va fournir la composante émotionnelle et affective de la douleur (Basbaum et al., 2009; Guirimand and Le Bars, 1996; Kandel and Schwartz, 2013)

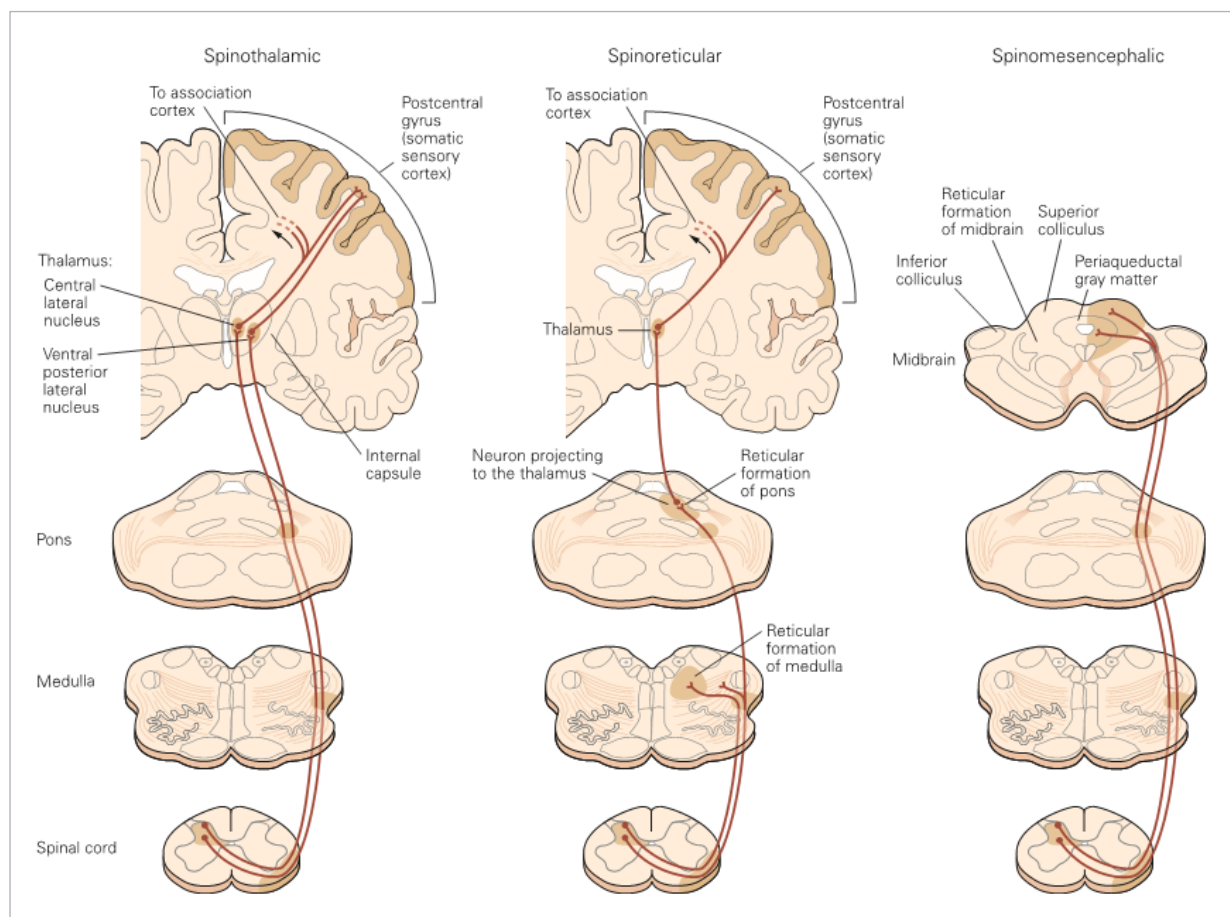


Figure 6 : Voies ascendantes de la douleur. Trois des cinq voies ascendantes qui transmettent l'information nociceptive de la moelle épinière aux centres supra-spinaux : les faisceaux spinothalamique (composante sensori-discriminative), spinoréticulaire (élaboration de réponses physiologiques) et spinomésencéphalique (composante émotionnelle et affective). D'après Kandel and Schwartz, 2013.

II TRANSDUCTION DU MESSAGE NOCICEPTIF : RÔLE DES CANAUX IONIQUES

Les fonctions principales des nocicepteurs sont la perception et la transduction des stimuli nocifs pour déclencher des potentiels d'action (PAs) qui se propagent le long de l'axone des fibres afférentes périphériques vers les synapses dans la corne dorsale de la moelle épinière.

Dans cette partie de l'introduction, nous nous intéresserons uniquement aux canaux ioniques qui interviennent dans les processus de transduction et de transmission du message nociceptif. Certains canaux ioniques, les canaux chargés de la détection et du codage du stimulus sont appelés canaux transducteurs. D'autres canaux excitateurs dépolarisants sont activés par certains types de stimuli pour dépolariser la membrane plasmique et transformer ainsi la stimulation en message électrique. Ils sont donc à l'origine du message nerveux. Le potentiel ainsi généré, appelé potentiel récepteur, se propage ensuite dans le neurone jusqu'à une zone appelée zone gâchette. Cette région contient de nombreux canaux sensibles au voltage qui vont initier un potentiel d'action (PA) si la dépolarisation est assez importante.

Les PAs se propagent ensuite sans atténuation jusqu'à la terminaison centrale du neurone nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les nocicepteurs y font synapse avec des neurones médullaires de second ordre. Les PA activent des canaux calciques sensibles au voltage (Ca_v) qui déclenchent la libération de neurotransmetteurs (**Figure 7**).

L'excitation des nocicepteurs et l'activité électrique des fibres afférentes sont donc principalement gouvernées par l'expression de canaux ioniques qui définissent le potentiel de repos membranaire, le seuil d'initiation de PAs, la dépolarisation et l'hyperpolarisation de la membrane. Ce sont donc les canaux ioniques exprimés au niveau du nocicepteur périphérique qui déterminent la sensibilité de chaque fibre aux différents types de stimuli.

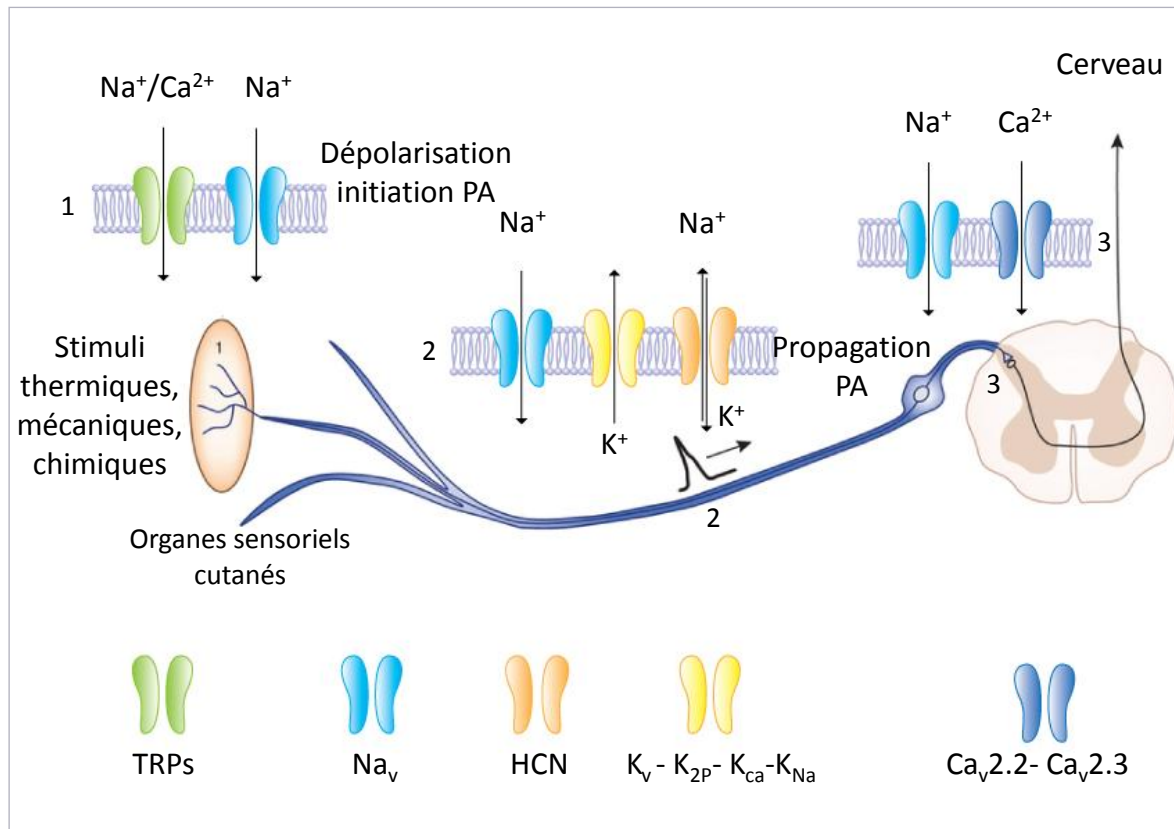


Figure 7 : Les canaux ioniques clés dans les voies de la douleur. L'activation de canaux cationiques non sélectifs et de canaux sodiques voltage-dépendants dans les terminaisons libres des neurones de DRG en réponse à divers stimuli (1) déclenche la dépolarisation de la membrane et l'initiation de PAs dans les fibres afférentes. Les PAs, produits via l'activation de canaux sodiques et potassiques dépendants du voltage, se propagent le long de l'axone (2) vers la terminaison nerveuse située dans la moelle épinière (3). La dépolarisation induite dans les neurones de la corne dorsale active des canaux calciques voltage-dépendants ce qui permet la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate et la SP. Les neurotransmetteurs activent ensuite des neurones qui projettent dans les centres nerveux supérieurs. Des exemples de canaux sodiques, potassiques, calciques et cationiques non sélectifs sont représentés en bas. *HCN*, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel; *K_v*, voltage-gated potassium channel; *K_{2P}*, two-pore potassium channel; *K_{ca}*, calcium-activated potassium channel; *K_{Na}*, sodium-activated potassium channel; *Ca_v*, voltage-gated calcium channel. Modifié d'après Waxman et al., 2014.

Plusieurs études ont permis d'identifier différents des canaux ioniques importants pour la perception douloureuse, notamment les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential), les canaux ASIC (Acid-Sensing Ion Channels), les canaux mécanosensibles Piezo et certains canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v). Nous allons introduire les principaux canaux transducteurs excitateurs impliqués dans la perception du stimulus nocif.

A. Les canaux TRP

Les canaux Transient Receptor Potential (TRP) ont été identifiés chez la Drosophile (**Montell and Rubin, 1989**). Ils ont été nommés d'après le phénotype d'un mutant drosophile qui présentait une réponse transitoire à la lumière plutôt qu'une réponse soutenue. Les canaux TRP ont été identifiés chez les mammifères, par étude d'homologie de séquence. Ils ont été impliqués dans la vision, l'olfaction, le goût, la sensibilité mécanique et thermique et la régulation osmotique (**Clapham, 2003**).

Chez les mammifères, on distingue vingt-huit canaux TRP répartis en six sous-familles : TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin) et TRPA (Ankyrin) (**Nilius et al., 2007**) (**Figure 8A**). Malgré une faible homologie de séquence entre les différentes sous-familles, les canaux TRP présentent tous une topologie membranaire similaire (**Figure 8B**). Chaque sous-unité contient six segments transmembranaires (S1 à S6) et une boucle hydrophobe entre S5 et S6 qui constitue le domaine pore. Les régions N- et C-terminales sont intracellulaires et contiennent des sites de régulation par des protéines kinases, des protéines chaperonnes et d'échafaudage. Il faut quatre sous-unités assemblées en homo- ou hétéro-tétramères pour former un canal fonctionnel (**Liao et al., 2013; Ramsey et al., 2006; Schaefer, 2005**). Tous les TRP sont des canaux cationiques non sélectifs dépolarisants et excitateurs pour la cellule. Ils augmentent les concentrations de calcium et de sodium intracellulaires. Ils sont largement exprimés dans les tissus, on les retrouve dans différents types cellulaires comme les cellules musculaires lisses, épithéliales, les cellules du système immunitaire ainsi que dans les neurones. Six des vingt-huit membres de la famille des TRP sont exprimés dans les neurones sensoriels ou les kératinocytes, des cellules de peau qui sont les cibles des afférences périphériques sensorielles : TRPV1-4, TRPM8 et TRPA1 (**Bourinet et al., 2014**) et ont été impliqués dans la détection de stimuli nocifs (**Figure 10**).

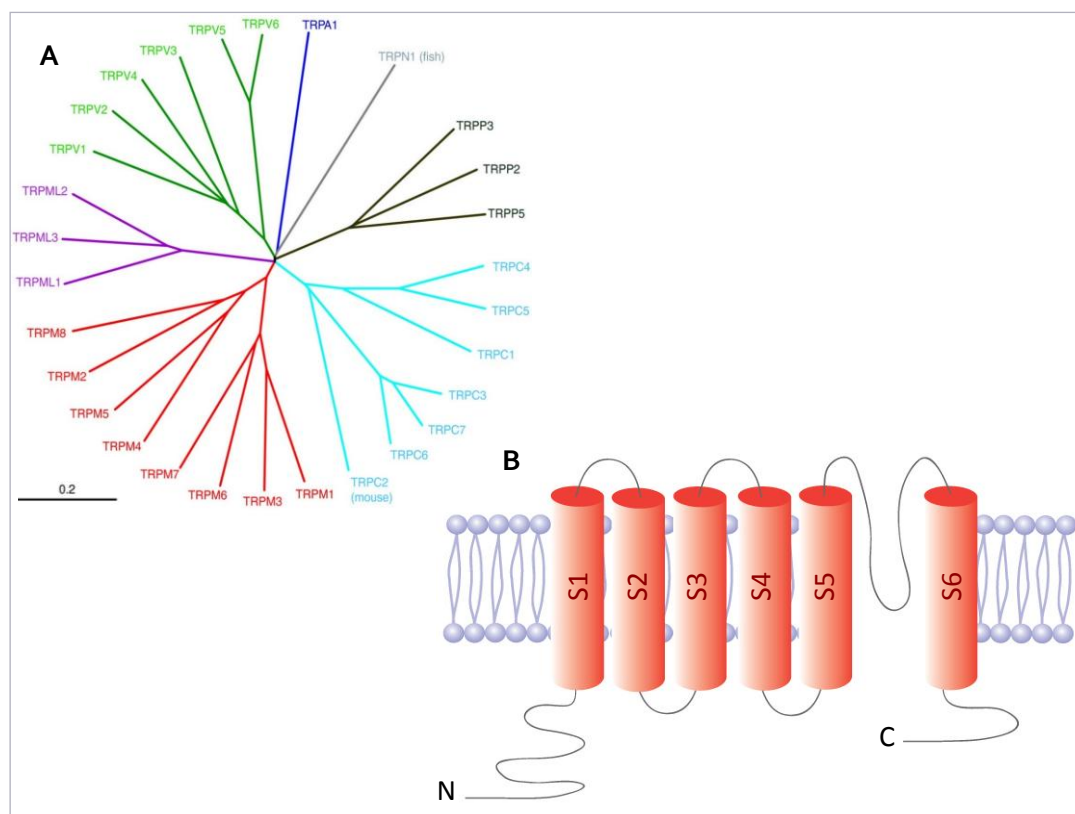


Figure 8 : Les canaux TRP. A. Arbre phylogénétique des canaux TRP. Par homologie de séquence, les canaux TRP sont regroupés en six sous-familles : TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloïde), TRPM (Melastin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin) et TRPA (Ankyrin). TRPC2 est présent chez la souris mais n'est qu'un pseudogène chez l'homme. TRPN1 n'est pas retrouvé chez les mammifères, seulement chez le poisson. D'après Nilius et al., 2011. B. Topologie des canaux TRP. Chaque sous-unité est composée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) et d'une boucle hydrophobe entre S5 et S6 qui constitue le domaine pore. Les extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques. Modifié d'après Julius et al. 2013.

1. TRPV₁ (VR₁)

Le canal TRP vanilloïde de type 1 (TRPV₁, aussi appelé VR₁) a été le premier TRP identifié dans les neurones nociceptifs (Caterina et al., 1997) grâce à son activation par la capsaïcine, un composé vanilloïde irritant, substance active du piment. C'est aussi le premier canal TRP dont la structure tridimensionnelle a été élucidée (Liao et al., 2013). Décrit dans les neurones de petit et moyen diamètres des ganglions sensoriels (DRG et trijumeaux), il est exprimé dans les fibres nociceptives de type C et Aδ (Figure 9). Chez le rongeur, il est présent dans 30 à 50% des neurones sensoriels (Kobayashi et al., 2005; Tominaga et al., 1998) et chez l'Homme dans 70% des neurones de DRG cervicaux (Anand et al., 2006). Il est également exprimé dans d'autres neurones du système nerveux périphérique, et il a été identifié dans des afférences vagues et trigéminales qui expriment la SP, le CGRP, et les récepteurs TrkA. Le canal TRPV₁ est aussi exprimé dans le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal et les épithéliums de la peau et de la vessie (Bourinet et al., 2014).

TRPV1 est un canal activé par le chaud nocif ($Q_{10} > 20$)¹ dont le seuil de sensibilité avoisine les 43°C (Caterina et al., 1997), une température qui correspond aux seuils de douleur chez l'Homme et l'animal ainsi qu'au seuil d'activation des fibres afférentes nociceptives (Cesare and McNaughton, 1996; LaMotte and Campbell, 1978). Plusieurs observations ont pu montrer une relation directe entre l'expression de TRPV1 et la thermosensibilité des cellules. Une étude électrophysiologique utilisant des cellules HEK293 transfectées pour exprimer TRPV1 montre une forte corrélation entre la sensibilité à la capsaïcine et la sensibilité à la chaleur tant au niveau de l'intensité que de la cinétique de la réponse (Tominaga et al., 1998). Cela a également pu être observé sur des neurones sensoriels de petit diamètre (Kirschstein et al., 1997; Nagy and Rang, 1999a). Il existe une désensibilisation croisée des réponses à ces deux stimuli, et les courants évoqués par la capsaïcine et la température sont diminués par des antagonistes de TRPV1 comme la capsazépine et le rouge de ruthénium (Kirschstein et al., 1999). De plus, ces deux réponses sont caractérisées par des courants à rectification sortante et une perméabilité relativement élevée aux ions calcium. Que ce soit dans des systèmes d'expression hétérologue ou dans des neurones sensoriels, l'augmentation de la température et la capsaïcine provoquent des courants unitaires en patch excisé, preuve que l'activation du canal par ces deux stimuli ne nécessite pas l'intervention d'un partenaire cytosolique (Tominaga et al., 1998). Néanmoins, une étude de neurones de DRG en patch excisé a montré une absence de superposition des réponses à ces deux stimuli ainsi qu'une insensibilité de certains courants activés par le chaud à l'antagoniste de TRPV1, la capsazépine (Nagy and Rang, 1999b). Cela suggère que TRPV1 n'est pas le seul canal impliqué dans la sensation du chaud.

TRPV1 a été originellement décrit comme indépendant du potentiel de membrane (Caterina et al., 1997). Or certaines des propriétés du canal sont voltage-dépendantes (Gunthorpe et al., 2000; Vlachová et al., 2003; Voets et al., 2004). Le seuil d'activation de TRPV1 en réponse à une augmentation de température est nettement abaissé lorsque la membrane est dépolarisée. La sensibilité thermique du canal est donc fortement dépendante du potentiel membranaire (Voets et al., 2004).

TRPV1 est également modulé par le pH. Les protons extracellulaires induisent des réponses excitatrices à la fois transitoire et soutenue de neurones sensoriels en culture, la seconde étant responsable de la douleur persistante associée à une acidose tissulaire sévère (Bevan and Geppetti, 1994). Il a été montré qu'une diminution du pH augmente la réponse évoquée par la capsaïcine et que les protons extracellulaires potentialisent les courants activés par la chaleur. De plus, une réduction du pH diminue le seuil d'activation du canal puisqu'à un pH de 6,3, on peut observer des courants à 35°C, une température où le canal est normalement fermé (Caterina et al., 1997; Jordt et al., 2000; Tominaga et al., 1998). Cette activation par les

¹ Q₁₀ : changement d'activité résultant d'une augmentation de température de 10°C. Plus cette valeur est élevée, plus la température influence l'ouverture du canal.

protons est observable en patch excisé, suggérant que les protons ont une action directe sur le canal (Tominaga et al., 1998). Il a aussi été montré que le canal TRPV1 était activé de façon directe par les lipides, en particulier les métabolites de lipides membranaires comme l'acide arachidonique, et par la pression ce qui lui permet d'être un senseur des changements osmotiques de la cellule (Tominaga et al., 1998). Certains médiateurs pro inflammatoires qui induisent une sensibilisation des nocicepteurs peuvent également moduler l'activité de TRPV1. La bradykinine et l'ATP extracellulaire potentialisent les réponses du canal via les récepteurs P2Y₂ et B2, respectivement, dans les systèmes d'expression hétérologue et les neurones de DRG (Sugiura et al., 2002; Tominaga et al., 2001). Ces deux médiateurs abaissent le seuil d'activation de TRPV1 jusqu'à 30°C et cette action PKC-dépendante puisque différents inhibiteurs de PKC bloquent à la fois la potentialisation et la sensibilisation du canal. Les prostaglandines (PGE₂), la sérotonine, l'histamine et le NGF, d'autres médiateurs pro inflammatoires sont capables eux aussi de moduler l'activité de TRPV1 ainsi que son trafic à la membrane induisant une sensibilisation du canal et une hyperalgésie thermique (Kanai et al., 2007; Tominaga and Caterina, 2004; Zhang et al., 2005).

Plusieurs études utilisant des souris invalidées pour le gène *Trpv1* ont permis de confirmer ces observations *in vivo* (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Les souris TRPV1^{-/-} présentent une réponse diminuée mais non abolie à la douleur thermique aiguë, confirmant qu'il n'est pas le seul canal impliqué dans la perception du chaud nocif. Par contre, on observe chez ces souris une perte complète de sensibilité à la capsaïcine. Néanmoins, une autre étude a montré que les souris TRPV1^{-/-} répondaient normalement aux stimuli thermiques et que TRPV1 ne serait pas nécessaire à la détection du chaud nocif (Woodbury et al., 2004). Cette étude révèle que TRPV1 n'est exprimé que dans une faible partie de neurones IB4-positifs et que les nocicepteurs IB4 positifs qui n'expriment pas le canal ont des réponses normales au chaud. L'ablation sélective des neurones TRPV1-positifs révèle que ces neurones sont des nocicepteurs médiant spécifiquement la douleur thermique et non la douleur mécanique (Mishra and Hoon, 2010). Ces neurones portent toute la sensibilité au chaud et sont responsables de la détection de températures entre 40°C et 50°C (Mishra et al., 2011; Pogorzala et al., 2013). C'est une population spécifique de nocicepteurs qui expriment TRPV1 qui est indispensable à la sensibilité au chaud, alors que le canal lui-même n'en serait que partiellement responsable. L'inflammation n'induit pas d'hyperalgésie thermique chez les souris knockout, ce qui démontre le rôle essentiel de TRPV1 dans la douleur inflammatoire (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). L'étude des souris TRPV1^{-/-} a également permis de mettre évidence le rôle de TRPV1 dans le fonctionnement de la vessie, la régulation de l'osmolarité, le diabète, la pancréatite, la toux, l'arthrite, l'anxiété et la fièvre (Barton et al., 2006; Birder et al., 2002; Ciura and Bourque, 2006; Iida et al., 2005; Marsch et al., 2007; Patapoutian et al., 2009; Razavi et al., 2006).

2. TRPV₂ (VRL-1)

Le canal TRPV₂ présente près de 50% d'homologie avec TRPV₁ (Ramsey et al., 2006). Des études fonctionnelles dans des ovocytes de Xénope et des cellules mammifères ont montré qu'il n'est pas sensible à la capsaïcine ni aux protons et qu'il s'active à des températures supérieures à 52°C (Caterina et al., 1999; Patapoutian et al., 2003). Il est exprimé dans une grande variété de tissus dont différentes régions cérébrales, la moelle épinière et les neurones de ganglions sensoriels mais aussi dans le plexus myentérique (Caterina et al., 1999; Lewinter et al., 2004; Nedungadi et al., 2012; Park et al., 2011). TRPV₂ est exprimé dans des fibres nociceptive de type Aδ et C (Ma, 2001) mais il est majoritairement exprimé dans les neurones sensoriels de moyen et grand diamètre qui projettent vers les laminae les plus profondes de la corne dorsale (Patapoutian et al., 2003). Il a également été décrit comme un canal mécanosensible, jouant un rôle dans la régulation de la sensibilité à l'hyper osmolarité tissulaire (Muraki et al., 2003). TRPV₂ pourrait être responsable de la détection de la chaleur hautement nocive (Caterina et al., 1999; Woodbury et al., 2004). Néanmoins, les souris TRPV₂^{-/-} ont une perception mécanique et thermique normale (Park et al., 2011) et les nocicepteurs n'exprimant pas TRPV₂ répondent normalement au chaud (Woodbury et al., 2004). TRPV₂ pourrait être impliqué dans la sensibilisation des fibres nerveuses puisque son expression dans les neurones de DRG augmente dans des conditions d'inflammation et de lésion nerveuse (Frederick et al., 2007; Shimosato et al., 2005).

3. TRPV₃ (VRL-2)

TRPV₃ est activé à des températures modérées, son seuil de sensibilité thermique étant d'environ 33°C, et il est sensible au camphre. Les courants TRPV₃ induits par la température présentent une forte rectification sortante, et augmentent avec la température (Peier et al., 2002a; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). Chez la souris, le canal TRPV₃ est exprimé dans les kératinocytes de la peau mais pas dans les neurones sensoriels (Peier et al., 2002a). Par contre on le retrouve dans les neurones sensoriels de singe et humains (Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). Dans un système d'expression hétérologue, TRPV₃ est capable d'interagir avec TRPV₁ et ces deux canaux sont coexprimés dans les neurones de DRG humains, néanmoins, on ne sait pas encore quels peuvent être les effets de cette interaction sur la fonction du canal (Smith et al., 2002). Les souris invalidées pour TRPV₃ présentent un thermotactisme altéré. La détection de températures modérées, tièdes, n'étant pas totalement abolie chez les souris knockout, TRPV₃ n'est pas le seul canal impliqué dans la perception de ces gammes de températures. De plus, les souris TRPV₃^{-/-} montrent un comportement nociceptif altéré pour des températures supérieures à 50°C, indiquant que TRPV₃ et TRPV₁ ont des fonctions chevauchantes dans la perception du chaud nocif. Toutefois, la perception au chaud des souris TRPV₁^{-/-}-TRPV₃^{-/-} est altérée mais pas abolie, indiquant qu'ils ne sont pas les seuls responsables de la perception de températures chaudes. TRPV₃ ne semble pas impliqué dans les douleurs inflammatoires ou neuropathiques puisque les

souris KO ne présentent pas de déficit dans l'hyperalgésie thermique induite dans ces conditions (Moqrich et al., 2005).

4. TRPV₄ (VROAC)

Le canal TRPV₄ a d'abord été identifié comme un canal sensible aux variations de l'osmolarité cellulaire (Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000). Mais il est, lui aussi, activé dans des gammes de températures modérées (25°C-34°C) (Güler et al., 2002; Watanabe et al., 2002). Contrairement à TRPV₃, TRPV₄ se désensibilise après une exposition répétée ou prolongée à une température supérieure à 42°C. (Güler et al., 2002). La température est un modulateur important de l'activité de ce canal car un réchauffement entraîne une activation plus rapide par les autres stimuli auxquels TRPV₄ est sensible. Par exemple, il n'est que modérément sensible à un gonflement cellulaire à température ambiante alors que sa réponse est fortement augmentée à 37°C (Güler et al., 2002). TRPV₄ est également sensible à l'anandamide, l'acide arachidonique et certains de ses métabolites (Watanabe et al., 2003). Même s'il ne semble pas être un transducteur direct des stimulations mécaniques, TRPV₄ pourrait être impliqué dans l'initiation de l'hyperalgésie mécanique. En effet, une stimulation hypo- ou hypertonique induit une hyperalgésie mécanique chez l'animal, qui est réduite après extinction *in vivo* du gène (Alessandri-Haber et al., 2003).

TRPV₄ est exprimé dans différents types cellulaires, dont les cellules endothéliales et épithéliales, les chondrocytes, les adipocytes et les neurones du SNC comme du SNP. Sa présence dans les neurones de DRG et des ganglions trigéminal suggère un rôle dans les réponses nociceptives mécaniques dans les tissus somatiques et les viscères. (Nilius and Voets, 2013).

Des études d'immunohistologie chez le rat et la souris ont montré une forte expression de TRPV₄ dans la peau, en particulier dans les kératinocytes (Güler et al., 2002).

Les souris invalidées pour TRPV₄ présentent un défaut de perception thermique (Lee et al., 2005; Todaka et al., 2004) et de régulation osmotique (Liedtke and Friedman, 2003; Mizuno et al., 2003) ainsi qu'une diminution de leur sensibilité à l'acide et un thermotactisme altéré (Suzuki et al., 2003). Par contre, les réponses au chaud nocif et à des stimuli mécaniques faibles sont conservées (Suzuki et al., 2003). Étonnamment, l'hyperalgésie thermique induite par une injection de carragénine est diminuée chez les souris TRPV₄^{-/-} suggérant un rôle du canal dans l'initiation d'une douleur inflammatoire (Todaka et al., 2004).

5. TRPM8 (CMR₁)

D'abord identifié dans la prostate comme un canal sensible aux androgènes (Tsavalier et al., 2001), TRPM8 a ensuite été décrit comme le principal senseur du froid chez les mammifères (Babes et al., 2011; Bautista et al., 2007; McKemy et al., 2002). Il est fortement activé par des températures inférieures à 26°C (Q₁₀ ~40) et il est sensible à des molécules qui induisent une sensation de froid comme le menthol l'eucalyptol et l'icilin (McKemy et al., 2002; Peier et al.,

2002b). Les variations de pH modulent également son activité puisqu'une acidification extracellulaire inhibe l'activation du canal par le menthol et l'icilin (Behrendt et al., 2004). TRPM8 est un canal voltage-dépendant (Voets et al., 2004). La dépolarisation de la membrane plasmique est capable d'activer le canal et elle modifie également sa thermosensibilité en déplaçant son seuil d'activation au froid vers des températures plus hautes (Voets et al., 2004).

TRPM8 est fortement exprimé par environ 15% des neurones somatosensoriels. On le retrouve dans 10% des neurones de DRG et des ganglions trijumeaux, en particulier dans les neurones de petit diamètre qui n'expriment pas les marqueurs classiques de nocicepteurs comme TrkA, le CGRP, la SP et la liaison de l'IB4 (Kobayashi et al., 2005; Peier et al., 2002b) (Figure 9). Ces observations sont cohérentes avec le pourcentage de neurones activés par le froid et le menthol évalué par des mesures de neurones sensoriels en culture (Reid and Flonta, 2001; Viana et al., 2002). Une infime partie des fibres exprimant TRPM8 pourraient coexprimer le canal TRPV1, ce qui expliquerait le phénomène de froid paradoxal (lorsque des températures supérieures à 45°C induisent une sensation de froid) (McKemy et al., 2002; Reid et al., 2002; Viana et al., 2002) mais il existe des divergences quant à cette colocalisation en fonction des études menées (Dhaka et al., 2006; Knowlton et al., 2013; Story et al., 2003; Takashima et al., 2007, 2010). Les canaux TRPM8 sont aussi retrouvés en dehors du système somatosensoriel : dans la vessie, la prostate et certains types de tumeur (Julius, 2013; Tsavaler et al., 2001).

Les souris invalidées pour TRPM8 présentent une sévère altération de la sensibilité au froid et ne sont plus capables de distinguer le tiède du froid. TRPM8 joue un rôle à la fois dans la perception du froid modéré et du froid nocif (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Par contre, leur sensibilité mécanique et au chaud nocif est préservée, indiquant une ségrégation fonctionnelle de ces modalités. L'hypersensibilité au froid induite par l'inflammation et certains traumatismes est significativement diminuée chez les souris TRPM8^{-/-} ou si on bloque le canal pharmacologiquement (Calvo et al., 2012; Colburn et al., 2007). Paradoxalement, un stimulus froid peut aussi avoir, dans un contexte inflammatoire ou de lésion, un effet analgésique qui serait dépendant de TRPM8 (Dhaka et al., 2007; Proudfoot et al., 2006). L'oxaliplatine, est une molécule de synthèse dérivée de platine utilisé dans les traitements anticancéreux dont l'un des effets secondaires le plus courant et le plus handicapant pour les patients est une forte allodynie au froid (Attal et al., 2009). Il a été montré que l'expression de TRPM8 dans les neurones de DRG de rat est sensiblement augmentée par le traitement à l'oxaliplatine (Anand et al., 2010; Gauchan et al., 2009; Kawashiri et al., 2012). De plus, les souris TRPM8^{-/-} ne développent pas d'hypersensibilité au froid après le traitement (Descœur et al., 2011), suggérant que TRPM8 joue un rôle majeur dans cet effet secondaire de l'oxaliplatine.

6. TRPA1 (ANKTM1)

Le canal TRPA1 a été impliqué dans la perception nociceptive. C'est l'unique membre de la famille TRPA et son nom vient du nombre important de domaines ankyrine qu'il porte sur sa terminaison NH2 (Story et al., 2003). TRPA1 est exprimé de façon spécifique dans une sous-population de neurones sensoriels exprimant les marqueurs nociceptif CGRP, SP et TrkA (Kobayashi et al., 2005; Story et al., 2003) (Figure 9). Il est souvent coexprimé avec le canal TRPV1, suggérant que ces deux canaux seraient responsables de la sensibilité thermique des nocicepteurs polymodaux (Story et al., 2003; Tominaga and Caterina, 2004).

TRPA1 est activé à des températures plus basses que TRPM8 (en dessous de 17°C), températures qui sont considérées comme douloureuses chez l'Homme (Karashima et al., 2009; Kwan et al., 2006; Story et al., 2003). Les souris TRPA1^{-/-} ont une réponse au froid fortement altérée à ~0°C. Elles ont également un défaut de sensibilité mécanique, mesuré à l'aide de filaments de von Frey (Kwan et al., 2006). De plus, les souris invalidées ne développent pas d'hyperalgésie thermique et mécanique après une injection intra plantaire de bradykinine dans la patte, suggérant un rôle de TRPA1 dans l'initiation de l'hypersensibilité induite par une inflammation (Bautista et al., 2006). TRPA1 a donc été proposé comme un détecteur de froid nocif séparément du canal TRPM8 car ils ne sont pas exprimé dans les mêmes sous populations de neurones des DRG. Mais le phénotype de perte sensibilité au froid des souris knockout pour TRPA1 a été remis en question et reste un sujet de controverse (Caspani and Heppenstall, 2009). En effet, alors que certaines études rapportent une perte de sensibilité marquée au froid chez les souris TRPA1^{-/-} (Karashima et al., 2009; Kwan et al., 2006), d'autres suggèrent que TRPA1 n'est pas nécessaire à la perception du froid, sa délétion n'affectant pas la réponse au froid des souris (Bautista et al., 2006; Knowlton et al., 2010). TRPA1 est un chémorécepteur important dans la nociception du fait de son large spectre d'activation par des molécules irritantes douloureuses. TRPA1 est activé par des isothiocyanates (huile de moutarde, wasabi, raifort) et des allícines (ail, échalotes) (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2005; Macpherson et al., 2007). TRPA1 est insensible au menthol mais peut être activé par l'icilin (Patapoutian et al., 2003). Contrairement à TRPM8, des études électrophysiologiques du canal exprimé dans des cellules CHO et des ovocytes de Xénope montrent que les courants TRPA1 se désensibilisent fortement après une exposition prolongée ou répétée au froid (Story et al., 2003). TRPA1 est également sensible à plusieurs médiateurs pro inflammatoires comme les prostaglandines, la bradykinine et certains produits du stress oxydatif (Andersson et al., 2008; Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Trevisani et al., 2007). Cette sensibilisation est dépendante de l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la PKA (Bautista et al., 2006; Wang et al., 2008). Enfin, l'expression de TRPA1 dans les neurones de DRG est augmentée après un traitement à l'oxaliplatine chez le rat et la souris (Descœur et al., 2011; Nassini et al., 2011) et les souris invalidées pour TRPA1 ne développent pas l'allodynie au

froid normalement induite par cet agent anticancéreux (Nativi et al., 2013; Trevisan et al., 2013). TRPA1 intervient donc dans l'allodynie au froid provoquée par un traitement à l'oxaliplatine.

Certains agents oxydants atmosphériques tels que les radicaux libres et l'ozone peuvent provoquer des dépressions respiratoires, une forte toux et une douleur profonde. Les souris TRPA1^{-/-} ne développent pas ces symptômes ce qui semble indiquer que TRPA1 a des effets au-delà de la perception douloureuse (Bessac et al., 2008).

7. Autres canaux TRP impliqués dans la thermo sensation

D'autres canaux TRP ont été impliqués dans la perception thermique nociceptive. Le canal TRPM3, exprimé dans les neurones de DRG et les ganglions trijumeaux de petit diamètre (Grimm et al., 2003), est activé par l'augmentation de la température. Il est responsable de la sensibilité thermique d'une sous-population de neurones sensoriels (Vriens et al., 2011). De plus, les souris invalidées pour TRPM3 ont un déficit de la sensibilité au chaud nocif et du développement de l'hyperalgésie thermique en conditions inflammatoires (Straub et al., 2013; Vriens et al., 2011).

Le canal TRPC5 est fortement activé par les températures froides entre 37°C et 25°C mais il est insensible au menthol. Il est exprimé dans les neurones de DRG et de la corne dorsale de la moelle chez la souris et l'homme (Zimmermann et al., 2011). La délétion de TRPC5 diminue significativement la fraction de neurones de DRG sensibles au froid, suggérant l'implication du canal dans la transduction du froid (Zimmermann et al., 2011). Mais l'étude des souris TRPC5^{-/-} ne présentent pas de déficit de la perception au froid ne confirmant pas les observations *in vitro*.

Les canaux TRP sont donc des senseurs essentiels de stimuli nocifs divers et de molécules libérées en cas de lésions ou de réponses immunitaires. Leur régulation par des molécules de signalisation et la modification de leur expression sont des facteurs clés de la douleur persistante et font des canaux TRP des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux analgésiques

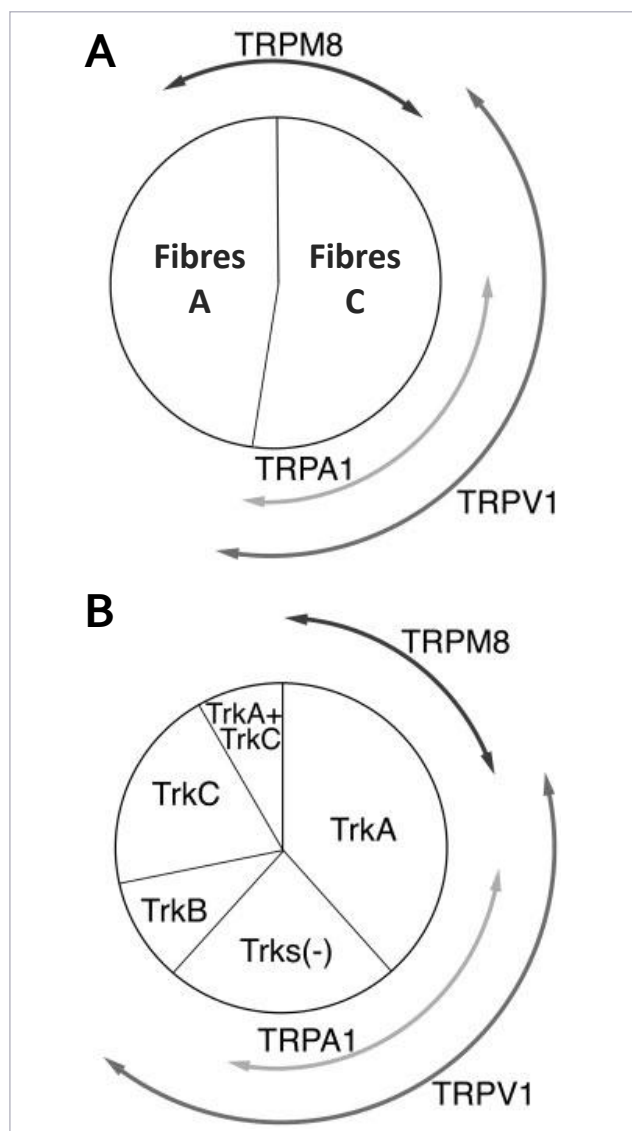


Figure 9 : Distribution des neurones exprimant les canaux TRPV1, TRPM8 et TRPA1. A. En fonction du type de fibres sensorielles périphériques. B. En fonction des marqueurs moléculaires des fibres sensorielles. D'après Kobayashi et al., 2005.

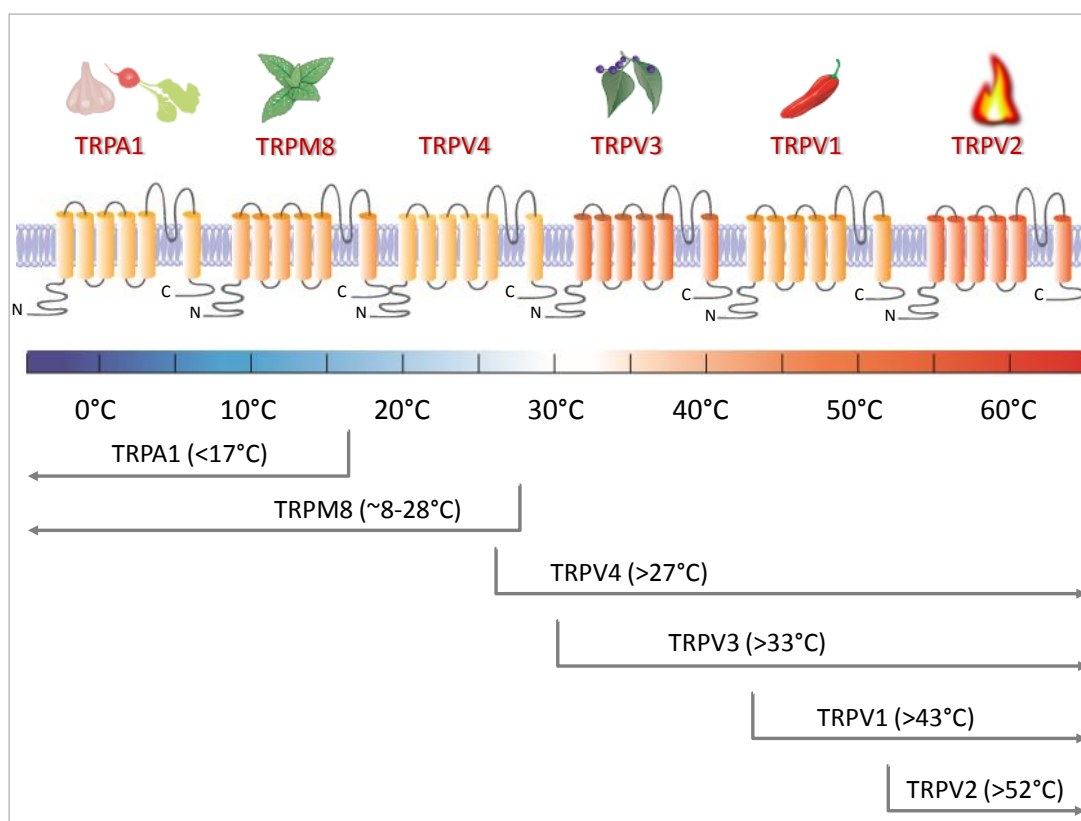


Figure 10 : Principaux canaux TRP impliqués dans la perception thermique. À 32°C, la température de la peau, seuls TRPV4 et TRPV3 sont actifs. TRPA1 et TRPM8 sont activés par le froid. TRPM8 est également sensible au menthol, TRPA1 est activé par les allícines (ail) ou des isothiocyanates (raifort). Le canal TRPM3 est activé dans des gammes de températures modérées et il est sensible au camphre. TRPV1 et TRPV2 répondent au chaud et induisent des sensations de brûlure. TRPV1 est le seul canal TRP activé par la capsaïcine (piment). D'après Kandel and Schwartz, 2013.

B. Les canaux ASIC

1. Structure, expression, régulations

Les canaux ASIC appartiennent à la superfamille des canaux cationiques ENaC/DEG sensibles à l'amiloride (Kellenberger and Schild, 2002). Le premier membre de la famille a été cloné dans les années 1990 sans information sur son mode d'activation et nommé alors MDEG/BCN1/BNaC1 (García-Añoveros et al., 1997; Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996). Leur nom ASIC (Acid-Sensing Ion Channel) a été donné après l'identification d'un autre membre en 1997 et la mise en évidence de son activation directe par les protons extracellulaires (Waldmann et al., 1997a). Ce sont des canaux cationiques dépolarisant, majoritairement perméables aux ions sodium et indépendants du voltage (Waldmann et al., 1997a). Chez le rongeur, il existe six sous-unités (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC3 et ASIC4), codées par quatre gènes (ACCN1-4). ASIC1 et ASIC2 ont chacun deux variants issus de promoteurs alternatifs : ASIC1a et b (Chen et al., 1998; García-Añoveros et al., 1997; Waldmann et al., 1997a)

et ASIC2a et b (García-Añoveros et al., 1997; Lingueglia et al., 1997; Price et al., 1996). Chez l'Homme, ASIC3 possède aussi plusieurs variants d'épissage (Delaunay et al., 2012).

Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires liés par une grande boucle extracellulaire et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Figure 11A). Les sous-unités s'assemblent en homo- ou hétéro-trimères pour former un canal fonctionnel (Gonzales et al., 2009; Jasti et al., 2007). Les sous-unités ASIC2b et ASIC4 ne peuvent pas à elles seules former des canaux fonctionnels homomériques (Akopian et al., 2000; Grunder et al., 2000; Lingueglia et al., 1997). ASIC2b peut s'associer avec d'autres sous-unités comme ASIC3 et ASIC2a pour en modifier les propriétés (Deval et al., 2004; Lingueglia et al., 1997). À ce jour, on ne sait pas encore quel est le rôle fonctionnel de la sous-unité ASIC4 (Akopian et al., 2000; Grunder et al., 2000) mais elle pourrait moduler négativement l'expression d'autres isoformes du canal (Donier et al., 2008).

Chez les rongeurs, ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont exprimés dans le SNC (Baron et al., 2002a, 2008; García-Añoveros et al., 2001; Price et al., 1996; Waldmann et al., 1997a; Wemmie et al., 2003) alors qu'ASIC1b et ASIC3 semble se limiter aux neurones périphériques (Chen et al., 1998; Poirot et al., 2006; Waldmann et al., 1997b). Chez l'Homme par contre, ASIC3 est présent à la fois dans le SNC et le SNP (Delaunay et al., 2012). Les canaux ASIC sont également présents dans des tissus non neuronaux : hypophyse, os, testicules, muscles lisses vasculaires, cellules épithéliales, adipeuses et immunitaires... (Lingueglia, 2007; Wemmie et al., 2013).

Les courants ASIC activés par une diminution du pH extracellulaire sont généralement transitoires. Leur seuil d'activation varie en fonction des sous-unités qui composent le canal (Figure 11B). ASIC1a et ASIC3 sont les plus sensibles aux protons, ils sont activés par une diminution de 0,2 à 0,4 unités de pH (à partir du pH physiologique 7,4) et leur pH de demi-activation ($pH_{1/2}$) se situe aux alentours de 6,5 (Deval et al., 2008; Lingueglia, 2007; Yagi et al., 2006). Les courants ASIC2a sont quant à eux activés par une diminution plus conséquente du pH : leur seuil de sensibilité se trouve autour de 6 et leur $pH_{1/2}$ entre 5 et 4 (Baron et al., 2001, 2002b; Lingueglia et al., 1997). Les canaux ASIC3 sont particuliers car ils génèrent un courant biphasique : un courant transitoire et un courant soutenu qui se maintient tant que le milieu extracellulaire reste acide (Deval et al., 2003; Salinas et al., 2009; Yagi et al., 2006).

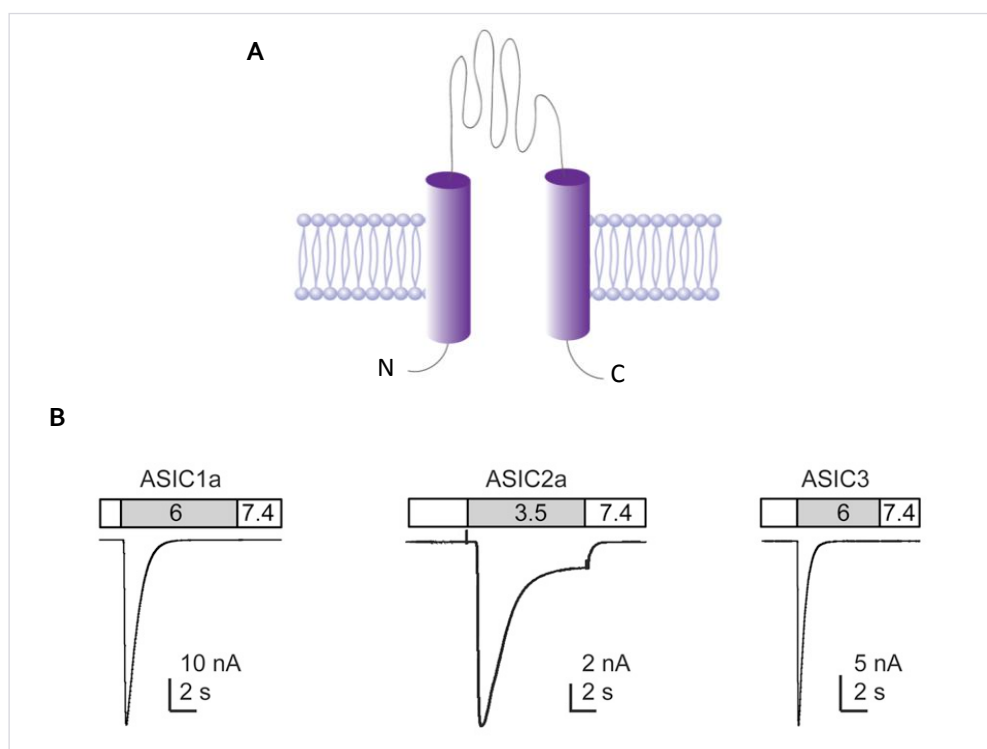


Figure 11 : Propriétés structurales et fonctionnelles des canaux ASIC. A. Topologie d'une sous-unité ASIC. Chaque sous-unité est composée de deux domaines transmembranaires qui encadrent une grande boucle extracellulaire et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires. D'après Lingueglia et al., 2014. B. Traces représentatives de courants ASIC1a, ASIC2a et ASIC3 induits par une acidification extracellulaire. Enregistrements patch clamp en cellule entière à -60mV de cellules CHO exprimant la sous-unité indiquée. D'après Kellenberger and Schild, 2015.

Les canaux ASIC peuvent faire partie de complexes macromoléculaires qui régulent leur localisation subcellulaire et leurs propriétés fonctionnelles (Bourinet et al., 2014). Ils peuvent interagir avec d'autres canaux ioniques (Donier et al., 2008; Gao et al., 2005; Petroff et al., 2008) mais aussi avec des protéines adaptatrices, impliquées dans le couplage avec des kinases, le cytosquelette et des récepteurs aux neurotransmetteurs, comme PSD95 (Hruska-Hageman et al., 2004) ou PICK1 (Baron et al., 2002b; Deval et al., 2004; Hruska-Hageman et al., 2002). De plus, leur capacité d'interaction avec la stomatine suggère qu'ils joueraient un rôle dans les complexes de mécanorécepteurs dans les neurones sensoriels (Wetzel et al., 2007).

2. Canaux ASIC et douleur

Les canaux ASIC sont exprimés dans pratiquement tous les types de neurones sensoriels périphériques, y compris dans les neurones de DRG de petit diamètre, les nocicepteurs (Bässler et al., 2001; Chen et al., 1998; Poirrot et al., 2006). De plus, une acidose modérée peut induire chez l'homme une sensation douloureuse (Issberner et al., 1996) qui est atténuée par des bloqueurs

non spécifiques des canaux ASIC : l'amiloride et certains NSAIDs (Jones et al., 2004; Ugawa et al., 2002). Cela suggérerait logiquement un rôle des canaux ASIC dans la perception de la douleur. Pourtant, il a été difficile d'établir au départ l'implication de ces canaux dans la nociception du fait d'une absence de phénotype clair chez les souris invalidées pour ASIC1a, ASIC2 et ASIC3 (Chen et al., 2002; Page et al., 2004; Price et al., 2000, 2001). La réponse des souris ASIC3^{-/-} à une injection acide dans la peau de la patte arrière ne diffère pas de la réponse des souris sauvages et l'hyperalgésie thermique induite par la carragénine est identique pour les deux génotypes (Chen et al., 2002; Price et al., 2001). Par contre, on observe chez ces souris une réponse altérée à des stimuli mécaniques intenses (Chen et al., 2002). Pour les souris ASIC2^{-/-}, les courants induits par un pH acide dans des neurones de DRG en culture et les réponses des nocicepteurs sont normaux (Price et al., 2000).

Les études réalisées chez l'homme et le rat utilisant des inhibiteurs pharmacologiques et des siRNA (small interfering RNA) ont démontré l'implication des canaux ASIC dans la douleur par acidose tissulaire (Deval et al., 2008; Dubé et al., 2005; Jones et al., 2004; Ugawa et al., 2002). La toxine PCTx1, un bloqueur des canaux ASIC1a, a permis de mettre en évidence le rôle d'ASIC1a en périphérie (Duan et al., 2007; Mazzuca et al., 2007) et la mambalgine-1, un inhibiteur des canaux ASIC1, a démontré l'effet analgésique du blocage des canaux ASIC1b périphériques (Diochot et al., 2012). Chez le rat, l'antagoniste non sélectif A-317576 a des effets analgésiques sur la douleur thermique inflammatoire et la douleur postopératoire (Dubé et al., 2005; Rocha-González et al., 2009). Plus spécifiquement, des études utilisant des siRNA dirigés contre ASIC3 et la toxine APETx2, un bloqueur des canaux ASIC3, ont montré l'impact d'ASIC3 dans la perception de la douleur en périphérie, et son implication dans la douleur inflammatoire (Deval et al., 2008; Mamet et al., 2003). On a également pu mettre en évidence un rôle d'ASIC1a et ASIC3 dans les nocicepteurs qui innervent les muscles, les impliquant dans la douleur musculaire et articulaire en conditions naïve et inflammatoire (Ikeuchi et al., 2008; Sluka et al., 2003; Walder et al., 2010). Les canaux ASIC3 sont impliqués dans la douleur postopératoire (Deval et al., 2011). De plus, les canaux ASIC contribuent nettement à la perception des stimuli mécaniques et chimiques dans les tissus viscéraux où ils sont fortement exprimés (Jones et al., 2005; Sugiura et al., 2005; Wulfsch et al., 2008). Enfin, ASIC3 aurait un rôle important dans la douleur ischémique cardiaque (Benson et al., 1999; Sutherland et al., 2001) et dans la réponse des voies respiratoires à l'acidité (Canning et al., 2006; Kollarik and Undem, 2002).

C. Les canaux Piezo

1. Structure, expression et régulations

Des courants mécanosensibles ont été rapportés dans de nombreux types cellulaires et dans les neurones de DRG (Delmas et al., 2011; McCarter et al., 1999). Pourtant, seuls quelques canaux activés par les stimuli mécaniques ont pu être identifiés. Certains canaux de la famille DEG/ENaC et des TRP semblent participer à la transduction mécanique mais l'implication directe de ces canaux dans ces processus n'a pas pu être clairement établie, du moins chez les mammifères (Chalfie, 2009; Delmas and Coste, 2013; Hamill and Martinac, 2001). Récemment, les canaux Piezo ont été identifiés comme des composants essentiels de la mécano transduction grâce à une étude de criblage de cellules de neuroblastome (Coste et al., 2010). Cette étude a permis d'identifier une famille de canaux comprenant deux membres : Piezo 1 et 2 (initialement appelés Fam38a et Fam38b).

Les canaux Piezo sont conservés chez les eucaryotes. Les canaux Piezo ne présentent pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines connues et on ne retrouve aucun motif typique à une structure de canal ionique (Delmas et al., 2011; Volkers et al., 2014). Ce sont de grosses protéines (plus de 2000 résidus) dont la particularité est le nombre important de segments transmembranaires qu'elles forment. En effet, selon la structure prédite, ces protéines seraient constituées de 24 à 39 domaines transmembranaires (Coste et al., 2012) (Figure 12A). Les protéines s'assemblent en homo-tétramères formant une structure unique avec 100 à 140 segments transmembranaires au total.

Les canaux Piezo ont une large expression, on les retrouve principalement dans les poumons, la vessie, le colon, l'estomac, les neurones de DRG et la peau. Piezo 1 est majoritairement exprimé dans les poumons, la vessie et la peau, il est pratiquement indétectable dans les neurones sensoriels de DRG. Piezo 2 est également largement exprimé dans les poumons mais, contrairement à Piezo 1, est fortement exprimé dans les neurones de DRG (Coste et al., 2010). Par hybridation *in situ*, il a été montré que Piezo 2 est présent dans près de 20% des neurones de DRG. On le retrouve principalement dans une sous-population de neurones qui expriment également la périphérine et le neurofilament 200, deux marqueurs des neurones de grand diamètre mécanosensibles, et dans certains neurones exprimant TRPV1, un marqueur des nocicepteurs (Coste et al., 2010).

Piezo 1 et 2 portent des courants cationiques non sélectifs mécanosensibles et dépendants du potentiel de membrane dont la cinétique est différente (Coste et al., 2010) (Figure 12B). Piezo 1 reconstitué dans des bicouches lipidiques artificielles n'est pas mécanosensible, suggérant que la mécanosensibilité implique la participation de partenaires protéiques ou lipidiques en interaction avec le canal pour en moduler l'activité (Coste et al., 2012). Les protéines Piezo forment un canal fonctionnel mais leur activité est modulée par des partenaires comme la

polycystine 2 (PC2) (Peyronnet et al., 2013), ou STOML3 (Stomatin-Like Protein 3) qui potentialisent l'activité de Piezo 1 et 2 en augmentant leur sensibilité mécanique (Poole et al., 2014).

Les canaux Piezo sont inhibés par des bloqueurs non spécifiques comme le rouge de ruthénium, le gadolinium et la streptomycine et par le peptide GsMTx4 (*Grammostola spatulata* mechanotoxin 4) (Bae et al., 2011; Coste et al., 2010).

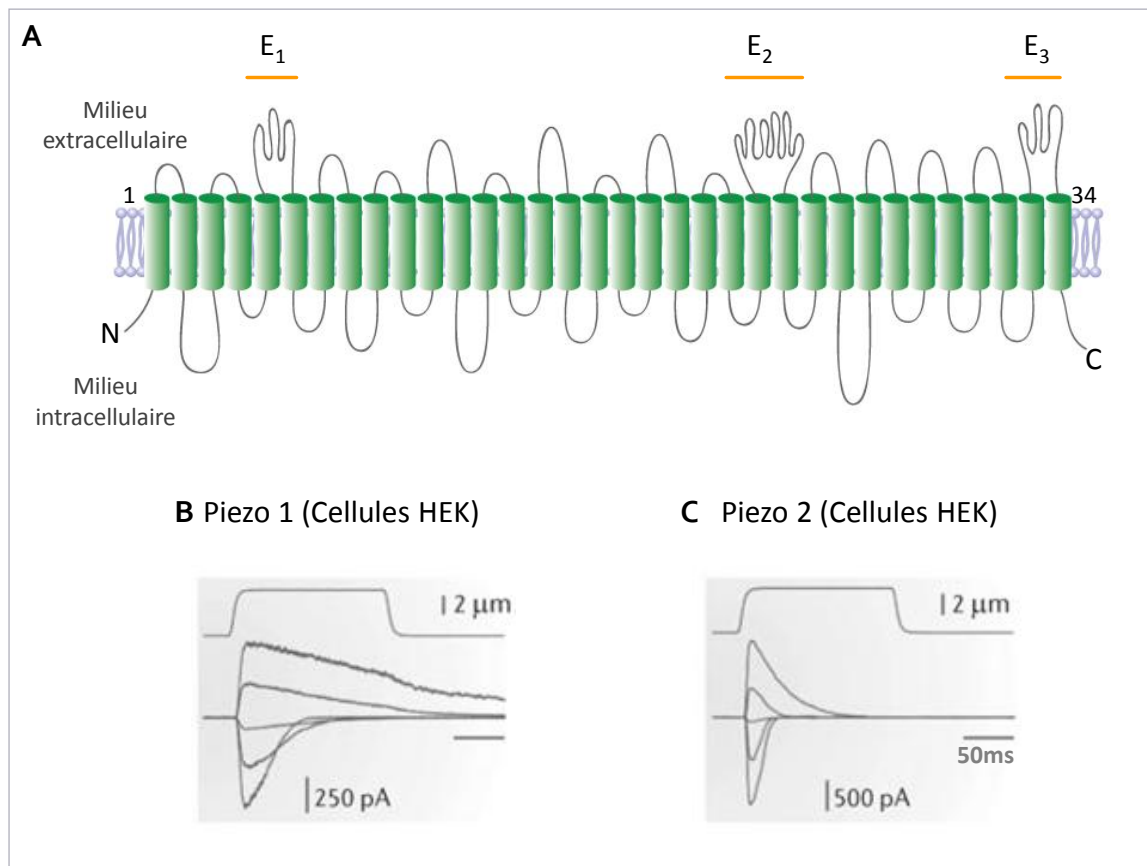


Figure 12 : Propriétés structurales et fonctionnelles des canaux Piezo. A. Topologie hypothétique de l'isoforme murine de Piezo2. Chaque sous-unité contiendrait 34 domaines transmembranaires, 3 grandes boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) et des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. B-C. Courants mécanosensibles induits à différents potentiels membranaires dans des cellules HEK exprimant Piezo 1 (B) ou Piezo 2 murin (C). D'après Delmas et al., 2011.

2. Rôle des canaux Piezo dans la nociception

DmPiezo, la seule copie du gène dans la drosophile, code pour un canal mécanosensible homologue à ceux retrouvés chez les mammifères (Coste et al., 2012). Le rôle des canaux Piezo dans la sensibilité mécanique de forte intensité, probablement douloureuse, a pu être observé chez la larve de *Drosophile* (Kim et al., 2012). Dans le poisson zèbre, l'invalidation de Piezo 2b *in vivo* (knockdown, KD) abolit presque totalement la perception du toucher léger (Faucherre et al., 2013). Les canaux Piezo semblent donc impliqués dans la perception mécanique bénigne et nocive.

Chez les mammifères, les études se sont concentrées sur Piezo 2 qui est le plus exprimé dans les neurones de DRG et des ganglions trijumeaux (Coste et al., 2010). L'invalidation de Piezo 2 par siRNA dans les neurones de DRG de souris abolit les courants mécanosensibles à adaptation rapide (RA) mais n'affecte pas les courants à adaptation lente (SA) (Coste et al., 2010). Ceci démontre le rôle de Piezo 2 dans la sensibilité mécanique non douloureuse. Piezo 2 a de même été impliqué dans l'allodynie mécanique associée aux douleurs neuropathiques (Eijkelkamp et al., 2013). Les courants Piezo 2 sont augmentés lorsque les neurones sensorielles sont stimulés par la bradykinine, un médiateur pro inflammatoire, et Piezo 2 a été impliqué dans l'hyperalgésie mécanique inflammatoire (Dubin et al., 2012).

Les canaux Piezo ont donc été impliqués dans la perception mécanique douloureuse ou pas, néanmoins de nombreuses questions subsistent encore sur leurs rôles spécifiques et sur leur structure. Les souris invalidées pour Piezo 1 ou 2 meurent au stade embryonnaire (Ranade et al., 2014) ou à la naissance (Dubin et al., 2012) respectivement, ce qui rend l'étude du rôle physiologique de ces canaux plus difficile avec ces modèles.

D. Les canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v)

Récemment, certains canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v) ont été impliqués dans la perception sensorielle et plus particulièrement dans la nociception (Waxman and Zamponi, 2014). Cependant, ces canaux diffèrent des canaux transducteurs présentés précédemment car ils ne sont pas impliqués dans la transduction directe mais plutôt dans l'excitabilité des nocicepteurs (Cummins et al., 2007).

Les canaux Na_v sont responsables de l'influx rapide de sodium dépolarisant pour déclencher et propager les PAs dans les cellules excitables. Neuf isoformes de la sous-unité α , notées $\text{Na}_v1.1$ à 1.9 , ont été caractérisées (Catterall et al., 2005). Elles partagent toutes la même structure mais se distinguent par leur séquence d'acides aminés, ce qui leur confère des propriétés différentes.

$\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ sont fortement exprimés dans les neurones de DRG et des ganglions trijumeaux (Cummins et al., 2007; Dib-Hajj et al., 1999), ils sont responsables de

l'excitabilité de ces neurones mais ne sont pas essentiels pour la fonction des neurones du SNC ou des myocytes cardiaques ce qui pourrait en fait une cible pharmacologique de choix dans le traitement de la douleur (Cummins et al., 2007; Waxman and Zamponi, 2014).

1. Nav1.7

Nav1.7 a d'abord été détecté dans les neurones somatosensoriels et les neurones de ganglions sympathiques (Toledo-Aral et al., 1997). On le retrouve aussi dans les neurones myentériques, les neurones du système olfactif, les neurones sensoriels viscéraux et les myocytes lisses (Dib-Hajj et al., 2013). Il est présent dans les neurones de DRG de petit et de grand diamètre, on a pu l'identifier dans des fibres de type A β et de type C (Djouhri et al., 2003), et dans des afférences libres dans l'épiderme (Persson et al., 2011).

Les courants Nav1.7 sont sensibles à la tétrodotoxine (TTX). Le courant Nav1.7 s'active et s'inactive rapidement mais la cinétique de récupération après inactivation est lente (Klugbauer et al., 1995). Ceci est cohérent avec leur expression préférentielle dans des fibres de type C qui ont une fréquence de décharge plus basse (Cummins et al., 2007).

La première évidence de l'implication de Nav1.7 dans la nociception vient de la découverte, chez l'homme, de l'association entre des mutations faux-sens du gène codant pour le canal (SCN9A) et d'importants troubles de la sensibilité douloureuse. L'érythromélgie (IEM), qui provoque des sensations intenses de brûlures des extrémités des membres après exposition à des stimuli de température modérée, et le syndrome de douleur extrême paroxystique (PEPD), une maladie héréditaire causant des douleurs violentes au niveau rectal, sont toutes les deux associées à des mutations « gain de fonction » du canal Nav1.7 (Fertleman et al., 2006; Dib-Hajj et al., 2005). Ces mutations induisent une hyperexcitabilité des neurones de DRG, ce qui diminue leur seuil de sensibilité et augmente leur fréquence de décharge en réponse à un stimulus (Dib-Hajj et al., 2013). En plus de ces mutations « gain de fonction » qui provoquent une douleur excessive, une mutation « perte de fonction » du canal Nav1.7 a été identifiée chez des patients touchés par une insensibilité congénitale à la douleur (Cox et al., 2006). Les souris KO Nav1.7 ne survivant pas après la naissance (Nassar et al., 2004), la majorité des études sur le rongeur ont été réalisées sur des KO conditionnels. Les canaux Nav1.7 ont un rôle majeur dans l'établissement de l'hypersensibilité thermique après une brûlure (Shields et al., 2012) et en conditions inflammatoires (Nassar et al., 2004). Il serait également impliqué dans l'hyperalgie mécanique induite par certaines conditions neuropathiques (Minett et al., 2014; Nassar et al., 2005). De plus, des études chez le rat ont montré que l'expression des canaux Nav1.7 était augmentée dans les neurones de DRG en réponse à une inflammation (Black et al., 2004). Ces canaux ont donc un rôle prédominant dans la douleur aiguë et l'hypersensibilité thermique inflammatoire.

2. Na_v1.8

Le canal Na_v1.8 est exprimé spécifiquement dans les neurones de DRG de petit diamètre et leurs axones, ainsi que dans les neurones des ganglions trijumeaux (Akopian et al., 1996; Dib-Hajj et al., 2010). Il est le principal canal sodique responsable de la genèse des PAs des neurones de DRG dans lesquels il est exprimé (Blair and Bean, 2003; Renganathan et al., 2001). Il est résistant à la TTX, son inactivation est lente ce qui limite la durée de décharge pendant une stimulation prolongée mais il récupère rapidement de l'inactivation, lui permettant de supporter une décharge à haute fréquence (Akopian et al., 1996; Renganathan et al., 2001).

Comme pour Na_v1.7, des mutations retrouvées chez l'homme démontrent son implication dans la perception douloureuse. Des patients souffrant de neuropathies périphériques douloureuses portent une mutation « gain de fonction » du gène codant pour Na_v1.8, SCN10A (Faber et al., 2012).

Les souris invalidées pour Na_v1.8 présentent une altération de la sensibilité aux stimuli nocifs thermiques et mécaniques et une diminution de l'hyperalgésie thermique inflammatoire induite par une injection de carragénine (Akopian et al., 1999). Chez les souris KO, il n'y a pas d'effet sur l'hyper sensibilité observée en conditions neuropathiques (Kerr et al., 2001; Nassar et al., 2005). Pourtant, grâce à des approches de KD sélectifs (Lai et al., 2002) ou l'inhibition spécifique du canal par le A-803467, (Jarvis et al., 2007), on peut observer que l'inhibition des canaux Na_v1.8 diminue l'hyperalgésie mécanique en conditions neuropathiques. Plus récemment, il a été montré que les souris invalidés pour Na_v1.8 ou dont on supprime spécifiquement les neurones exprimant le canal, ont une altération de la sensibilité au froid et aux stimuli mécaniques (Abrahamsen et al., 2008; Zimmermann et al., 2007).

Les canaux Na_v1.8 semblent donc avoir un rôle décisif dans la perception thermique (froid) et mécanique des nocicepteurs ainsi que dans la douleur inflammatoire. Leur rôle éventuel dans la douleur neuropathique reste controversé.

3. Na_v1.9

Le canal Na_v1.9 est lui aussi spécifiquement exprimé dans les neurones de DRG et des ganglions trijumeaux, en particulier dans les nocicepteurs (Dib-Hajj et al., 1998, 2002). Les courants Na_v1.9 sont résistants à la TTX, et activés par des potentiels de membrane proches du potentiel de repos de la membrane. Les cinétiques d'activation et d'inactivation sont très lentes et son activation résulte en un courant persistant (Cummins et al., 1999). Les canaux Na_v1.9 ne sont donc pas à l'origine des PAs dans la cellule mais interviennent dans la détermination du potentiel de repos membranaire afin d'augmenter l'excitabilité de la cellule (Baker et al., 2003; Östman et al., 2008).

Des mutations « gain de fonction » du gène SCN11A, codant pour Nav1.9, ont été découvertes chez des patients atteints de neuropathies périphériques douloureuses (Huang et al., 2014) et de douleurs épisodiques chroniques (Zhang et al., 2013) mais aussi, de façon plus surprenante, chez des patients touchés par des insensibilités congénitales à la douleur (Leipold et al., 2013). Dans les deux premiers cas, les mutations observées augmentent l'excitabilité des nocicepteurs et par conséquent l'activité évoquée et spontanée de ces neurones (Huang et al., 2014; Zhang et al., 2013) tandis que la dernière mutation induit une activité excessive du neurone au potentiel de repos, ce qui dépolarise de façon soutenue les nocicepteurs et altère la génération de PAs, empêchant la transmission du message douloureux (Leipold et al., 2013).

Les souris invalidées pour Nav1.9 ont une sensibilité thermique et mécanique normale (Amaya et al., 2006; Priest et al., 2005) mais présentent une diminution de l'hypersensibilité thermique et mécanique en conditions inflammatoires (Amaya et al., 2006; Lolignier et al., 2011; Priest et al., 2005). Chez le rat, l'expression de Nav1.9 est augmentée dans des modèles de neuropathie diabétique (Craner et al., 2002).

Ces études ont permis d'établir que le canal Nav1.9 ne serait pas impliqué dans la nociception en conditions basales mais jouerait un rôle dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques.

4. Autres canaux Nav

Les canaux Nav1.3 ont eux aussi été impliqués dans la nociception. Ce canal n'est pas détectable dans le SNC du rongeur adulte mais, suite à une lésion nerveuse, son expression est augmentée dans les neurones de DRG périphériques (Black et al., 1999) ainsi que dans les neurones de second et de troisième ordre des voies ascendantes de la douleur, dans la moelle épinière et le thalamus (Hains et al., 2004).

Dans cette partie, nous avons passé en revue les principaux canaux transducteurs excitateurs impliqués dans la douleur. Mais les canaux inhibiteurs, principalement les canaux potassiques jouent également un rôle primordial dans la modulation du message douloureux, tant au niveau périphérique qu'au niveau central.

E. Les canaux potassiques dans la douleur

Les canaux potassiques forment la plus grande famille de canaux ioniques. Il existe plus de 70 gènes codant pour les sous-unités des canaux K⁺. Cette grande diversité génique donne à ces canaux une large variabilité structurale et fonctionnelle.

Les canaux K⁺ sont exprimés dans la plupart des cellules. Ils participent à l'homéostasie du potassium et sont essentiels à de nombreuses fonctions cellulaires comme la régulation du volume, l'électrogénèse membranaire, la croissance et la prolifération cellulaire. Ils permettent de

porter le potentiel de membrane à un niveau proche de celui du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ , soit -90mV, et vont donc réguler l'activité électrique au niveau de la membrane plasmique. Au repos, leur activité est prépondérante par rapport aux autres canaux ioniques et ils déterminent la valeur du potentiel de repos cellulaire. Ils s'opposent à la dépolarisation par d'autres canaux et ont un effet inhibiteur. Ils jouent donc un rôle majeur dans le contrôle de l'excitabilité membranaire et dans la genèse et la fréquence des PAs et sont impliqués dans divers processus physiologiques comme la transmission synaptique, la contraction musculaire ou la régulation du rythme cardiaque.

Les différents types de sous-unités présentent un nombre variable de segments transmembranaires (TM) et un ou plusieurs domaines pores (P). Quatre domaines P doivent s'associer afin de former un pore-canal sélectif au K^+ . Il existe trois familles de canaux K^+ , les canaux dépendants du potentiel membranaire (K_V) avec 6 TM et un domaine P, les canaux à rectification entrante (K_{ir}) avec 2 TM et un domaine P et les canaux potassiques de fond à 4 TM et deux domaines P (K_{2P}). Les K_V sont ouverts par la dépolarisation de la membrane et accélèrent sa repolarisation en fin de PA. Les K_{ir} peuvent être ouverts de façon constitutive ou bien régulés par des ligands intracellulaires : les canaux GIRK, couplés à une protéine G ; K_{Ca} et K_{Na} dépendants des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} et de Na^+ ; K_{ATP} sensibles à l'ATP. Ils sont responsables du maintien du potentiel de repos.

Les canaux K_V , GIRK, K_{Ca} et K_{Na} et les canaux K_{2P} ont un rôle essentiel dans la transmission et la modulation du message douloureux (Waxman and Zamponi, 2014).

Les canaux GIRK ont été rapidement identifiés comme des acteurs majeurs de la transmission et la modulation du message douloureux (Lüscher and Slesinger, 2010; Ocaña et al., 2004; Waxman and Zamponi, 2014). Dans la moelle épinière, ils jouent un rôle dans l'analgésie induite par la morphine (Ikeda et al., 2000; Marker et al., 2005). Nous détaillerons cette implication dans la dernière partie de l'introduction.

Les canaux K_{ATP} ont été impliqués par plusieurs études dans la modulation de l'excitabilité des neurones en conditions pathologiques ou non (Chi et al., 2007; Du et al., 2011; Kawano et al., 2009; Sarantopoulos et al., 2003; Zoga et al., 2010). De plus, les K_{ATP} interviennent dans l'effet analgésique de la morphine (Afify et al., 2013; Ocaña et al., 2004).

Les neurones sensoriels expriment une grande variété de canaux potassiques voltage-dépendants. Dans des modèles de douleur neuropathique diabétique, on observe une diminution de l'expression de certaines sous-unités K_V qui génèrent des courants transitoires (I_A) (Cao et al., 2010). D'autres études ont montré que l'expression des sous-unités $K_V3.1$, $K_V1.1$ et $K_V1.2$, générant des courants à rectification retardée (I_K), était réduite dans différents modèles de douleurs neuropathiques (Gu et al., 2012; Ishikawa et al., 1999; Zhao et al., 2013). De plus, les sous-unités $K_V1.1$ et $K_V1.2$ contribuent aux courants potassiques mécanosensibles qui régulent l'activité des mécanorécepteurs (Hao et al., 2013).

Les canaux HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated), qui présentent la particularité d'être quasiment autant perméable au sodium qu'au potassium, sont activés par l'hyperpolarisation de la cellule. Contrairement aux autres canaux potassiques, leur activation dépolarise les cellules (Biel et al., 2009). De plus en plus d'études impliquent ces canaux dans la douleur. Les souris invalidées pour HCN1 présentent une diminution de l'allodynie au froid après ligature du nerf sciatique et une altération de la perception au froid (Momin et al., 2008). De plus, en conditions neuropathiques provoquées par l'oxaliplatine, on observe une surexpression des canaux HCN1 (Descœur et al., 2011). D'autre part, l'étude des souris invalidées pour le canal HCN2 a montré que HCN2 est impliqué dans l'hyperalgésie mécanique dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Emery et al., 2011; Schnorr et al., 2014).

Les canaux KCa sont importants pour l'hyperpolarisation qui suit un PA (after hyperpolarization, AHP) et donc pour le pattern d'activation des neurones (Berkefeld et al., 2010). La famille des KCa comprend trois sous-familles qui se distinguent par la conductance des canaux. Il existe des courants à grande conductance nommés BK (Big), à conductance intermédiaire IK (Intermediate) et à petite conductance SK (Small), et ces trois sous-types sont exprimés dans les neurones sensoriels (Li et al., 2007; Mongan et al., 2005). Les canaux SK et BK semblent réguler les activités de fibres afférentes et donc moduler la transmission du message sensoriel (Bahia et al., 2005; Zhang et al., 2010). Après un dommage nerveux, l'expression des canaux SK et IK diminue dans les neurones de DRG humains (Boettger et al., 2002). D'autre part, l'expression des canaux BK dans les neurones de DRG de rat est réduite dans un modèle de ligature de nerf spinal (Zhang et al., 2010).

Enfin, plusieurs membres de la famille K_{2P} ont été impliqués dans la douleur, principalement les canaux TREK (TWIK RElated K⁺ channels). Mon travail de thèse s'est axé sur l'étude du rôle des canaux potassique de fond TREK dans la nociception et l'analgésie par la morphine. Le chapitre suivant a donc pour but de présenter la famille des canaux K_{2P} et en particulier les canaux TREK.

III LES CANAUX TREK

Les canaux TREK appartiennent à la famille des canaux potassiques à deux domaines pore, les K_{2P} . Cette famille comprend 15 membres répartis en six sous-familles sur la base de similitudes de séquence et ressemblances fonctionnelles : les canaux TWIK (Tandem of pore domain in a Weak Inward rectifying K^+ channels), TASK (TWIK related Acid-Sensitive K^+ channels), TALK (TWIK related ALKaline pH-activated K^+ channels), THIK (Tandem pore domain Halothan Inhibited K^+ channels), TRESK (TWIK RElated Spinal cord K^+ channels) et TREK (Enyedi and Czirják, 2010) (Figure 13A).

Malgré une homologie de séquence relativement faible entre les membres des différentes sous-familles (autour de 40%), tous les canaux K_{2P} présentent la même topologie. Chaque sous-unité est composée de quatre domaines TM et de deux boucles P. Les extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques mais la région C-terminale est plus longue et peut contenir plus d'une centaine de résidus (Enyedi and Czirják, 2010; Lesage and Lazdunski, 2000) (Figure 13B). Le pore du canal est caractéristiquement composé de quatre domaines P, les sous-unités de canaux K_{2P} s'associent alors en homo- ou hétéro-dimères pour former un canal fonctionnel (Lesage et al., 1996). Les boucles P contiennent la séquence conservée des canaux K^+ , T-X-G-X-G, qui forme le filtre de sélectivité pour le potassium. Une des caractéristiques de ces canaux est la présence d'une large boucle extracellulaire de 60 à 70 acides aminés entre les domaines TM1 et P1 qui s'arrange en hélice α et qui contribue à la dimérisation (Brohawn et al., 2012; Enyedi and Czirják, 2010; Lesage et al., 1996; Miller and Long, 2012).

Les canaux K_{2P} sont responsables de courants de fond, aussi appelés courants de fuite, indépendants du potentiel de membrane. Ils sont constitutivement ouverts et jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos. Ce sont donc des acteurs majeurs de l'excitabilité cellulaire. En effet, ces canaux entraînent le potentiel de repos des cellules à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium et s'opposent à l'effet exciteur des perméabilités sodiques et calciques dépolarisantes. Ils sont généralement insensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques comme le tétraéthylammonium (TEA), la 4-Aminopyridine (4-AP), la quinidine et le césium mais peuvent être modulés par une grande variété de stimuli (Honoré, 2007; Kim, 2005; Noël et al., 2011; Patel and Honoré, 2001).

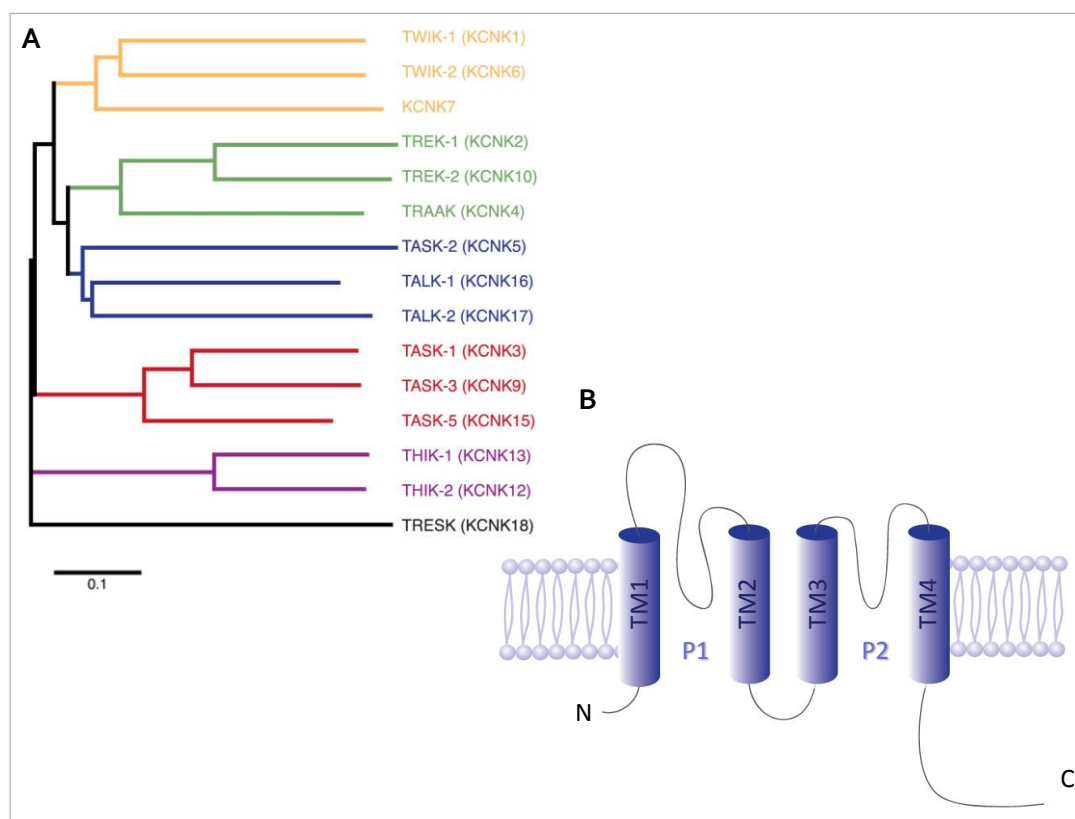


Figure 13 : Les canaux potassiques à deux domaines P (K_{2P}). A. Dendrogramme de la famille des K_{2P}. Elle est composée de 15 membres répartis par homologie de séquence et ressemblances fonctionnelles en 6 sous-familles. B. Topologie schématique d'une sous-unité d'un canal K_{2P}. Chaque sous-unité possède 4 domaines transmembranaires (TM) et deux domaines pore (P). Les extrémités N- et C-terminales sont cytosolique et on note la présence d'une boucle extracellulaire entre le segment TM1 et le domaine P1. D'après Enyedi and Czirják, 2010.

Les neurones sensoriels de DRG expriment différents canaux K_{2P}, dont les canaux TRESK, TREK, TASK et THIK (Kang and Kim, 2006; Marsh et al., 2012). Les canaux TRESK contribuent d'ailleurs à l'excitabilité des nocicepteurs et sa surexpression diminue la douleur neuropathique (Tulleuda et al., 2011; Zhou et al., 2013). Il a été également montré récemment que l'un des membres de la sous-famille TASK, le canal TASK-3, participe à la perception thermique des neurones sensoriels de DRG (Morenilla-Palao et al., 2014).

Dans mon travail de thèse, j'ai étudié les canaux TREK et leur rôle dans la douleur. La sous-famille TREK comprend trois membres : TREK-1 (KCNK2) (Fink et al., 1996), TREK-2 (KCNK10) (Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000a) et TRAAK (TWIK Related Arachidonic acid Activated K⁺ channels, KCNK4) (Fink et al., 1998).

A. Le canal TREK-1

Le canal TREK-1 est le premier membre de la sous-famille TREK à avoir été identifié (Fink et al., 1996). Il est composé de deux sous-unités de 426 acides aminés chez l'homme et le rat et 411 acides aminés chez la souris (Goldstein et al., 2005).

TREK-1 est fortement exprimé dans le cerveau et en particulier dans les neurones GABAergiques du noyau caudé et du putamen (Hervieu et al., 2001). On le retrouve également dans le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'hypothalamus, les neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé et dans la moelle épinière (Fink et al., 1996; Hervieu et al., 2001; Meadows et al., 2000; Medhurst et al., 2001). L'expression de TREK-1 dans le SNC n'est pas restreinte aux neurones car le canal est exprimé dans les astrocytes corticaux où il contribue à leur fort courant de fuite (Mi Hwang et al., 2014; Zhou et al., 2009). TREK-1 a également une large distribution dans le système nerveux périphérique. On retrouve un fort taux d'expression du canal dans les neurones somatosensoriels, en particulier dans les neurones de DRG de grand et petit diamètre et dans les neurones des ganglions trijumeaux où ils jouent un rôle dans la perception de différents stimuli (Alloui et al., 2006; Medhurst et al., 2001; Noël et al., 2009). L'expression de TREK-1 a aussi pu être détectée dans le système nerveux autonome, les afférences vagales (Zhao et al., 2010) et dans les ganglions sympathiques cervicaux (Cadaveira-Mosquera et al., 2011).

En dehors du système nerveux, TREK-1 est exprimé dans les cellules musculaires de l'intestin, dans la vessie et dans les artères de la paroi utérine, les artères basilaires, mésentériques et pulmonaires (Buxton et al., 2010; Gardener et al., 2004; Medhurst et al., 2001; Sanders and Kho, 2005).

L'épissage alternatif du premier exon du gène codant pour TREK-1, qui correspond à l'extrémité N-terminale du canal, produit deux variants d'épissage de 411 et 426 acides aminés (Fink et al., 1996; Li et al., 2006). L'importance de ces variants est encore inconnue car les deux isoformes partagent les mêmes propriétés biophysiques et mécanismes de régulation (Li et al., 2006).

En plus de ces variants d'épissage, il existe une forme tronquée de TREK-1 (TREK-1ΔEx4) composée seulement de 141 acides aminés et qui comprend l'extrémité N-terminale, le premier domaine TM et une extrémité extracellulaire (Veale et al., 2010). TREK-1ΔEx4 n'a pas d'activité propre mais il est fortement exprimé dans le cerveau de rongeur, suggérant qu'il ait un rôle fonctionnel. Cette version tronquée a une activité de dominant négatif, elle interfère avec le transport à la membrane du canal TREK-1, diminuant ainsi le courant généré par le canal natif à la membrane (Veale et al., 2010).

Enfin, une traduction alternative issue d'un second site d'initiation peut produire une version du canal déletée de ces 56 premiers acides aminés, Δ1-56 TREK-1 (Thomas et al., 2008). TREK-1 et Δ1-56 TREK-1 n'ont pas le même pattern d'expression dans le SNC de rat. La version tronquée

produit un courant de plus faible amplitude et a une sélectivité au potassium significativement réduite ce qui permet le passage d'ions sodium. Son potentiel d'inversion se trouve autour de -60mV, ce qui est bien plus dépolarisé que celui du canal natif, autour de -90mV. Son expression dans des neurones d'hippocampe dépolarise d'ailleurs considérablement leur potentiel membranaire (Thomas et al., 2008).

1. Propriétés électrophysiologiques

Le canal TREK-1 exprimé dans un système d'expression hétérologue produit un courant à rectification sortante (Fink et al., 1996). La rectification est due à un blocage du pore par un ion magnésium qui est levé lorsque la membrane est dépolarisée (Maingret et al., 2002). Le canal TREK-1 s'active de façon instantanée ce qui signifie qu'il est constitutivement ouvert et donc indépendant du voltage (Fink et al., 1996; Maingret et al., 2002). TREK-1 ne possède pas de domaine senseur de potentiel. TREK-1 est un canal de fuite dont l'état d'ouverture est régulé par des facteurs externes. La conductance unitaire de TREK-1 est de 48pS en conditions physiologiques, et de 101pS en conditions de K⁺ symétrique (Patel et al., 1998). L'une des particularités du canal TREK-1 est son « flickering » important qui traduit une oscillation très rapide entre les états ouvert et fermé du canal (Fink et al., 1996).

2. Régulations et partenaires protéiques

a. Pharmacologie

Le canal TREK-1 n'est pas inhibé par les bloqueurs classiques des canaux potassiques : le TEA et la 4-AP (Fink et al., 1996; Patel et al., 1998). Il est en revanche modulé par un grand nombre d'agents pharmacologiques. TREK-1 est inhibé par la fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine (Heurteaux et al., 2006; Kennard et al., 2005) et par des anesthésiques locaux comme la lidocaïne et la bupivacaïne, (Nayak et al., 2009; Punke et al., 2003; Shin et al., 2014).

TREK-1 est activé par les anesthésiques volatils généraux à des doses cliniques comme le chloroforme, l'éther, l'halothane et l'isoflurane (Patel et al., 1999). Il est également activé par des anesthésiques gazeux comme l'oxyde d'azote, le xénon ou le cyclopropane (Gruss et al., 2004). La stimulation du canal par les anesthésiques est observée en configuration de patch-clamp en patch excisé (enregistrement du canal unitaire), ce qui semble indiquer que ces agents ont un effet direct sur le canal. De plus, la région C-terminale du canal jouerait un rôle majeur dans ces régulations (Gruss et al., 2004; Patel et al., 1999). Le Riluzole, un agent neuroprotecteur utilisé pour protéger les motoneurones dans les cas de la sclérose latérale amyotrophique, peut activer TREK-1 de façon transitoire (Duprat et al., 2000).

Récemment, on a pu identifier le premier composé inhibiteur spécifique des courants TREK-1, un peptide issu du clivage du récepteur à la neurotensine 3 (Mazella et al., 2010).

b. Mécanosensibilité

TREK-1 est un canal mécanosensible qui est directement activé par des étirements de la membrane (Berrier et al., 2013; Honoré et al., 2006; Maingret et al., 1999a; Patel et al., 1998) (Figure 14). Des enregistrements de l'activité du canal en patch clamp en configuration cellule entière et en patch excisé ont montré qu'une dépression appliquée sur la membrane provoque l'ouverture progressive et réversible du canal ce qui suggère un mécanisme d'activation directe du canal par la déformation de la membrane plasmique (Patel et al., 1998) (Figure 14B). Le canal TREK-1 est préférentiellement activé par une déformation convexe de la membrane, observable par exemple lors d'un gonflement cellulaire en cas d'hypo-osmolarité extracellulaire, alors qu'une déformation concave (en cas d'hyper-osmolarité extracellulaire) l'inhibe (Berrier et al., 2013). Les crénateurs, tels que le trinitrophénol, qui s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane, provoquent une déformation convexe de la membrane et active les canaux TREK-1. Inversement, le courant TREK-1 est fortement réduit par la chlorpromazine et la tétracaine qui provoquent une déformation concave de la membrane en s'insérant dans le feuillet interne (Patel et al., 1998). L'extrémité du quatrième TM et le segment initial du domaine C-terminal du canal qui sont en interaction avec les phospholipides membranaires sont des acteurs essentiels de la sensibilité mécanique de TREK-1 (Chemin et al., 2005a). Néanmoins les expériences de substitution du domaine C-terminal de TREK-1 sur TASK3, un canal non mécano-sensible, ne confère pas cette sensibilité mécanique au canal chimérique (Patel et al., 1998). La sensibilité mécanique de TREK-1 ne dépendrait pas d'une protéine d'ancrage de la membrane plasmique mais directement de l'interaction avec les lipides membranaires (Brohawn et al., 2014).

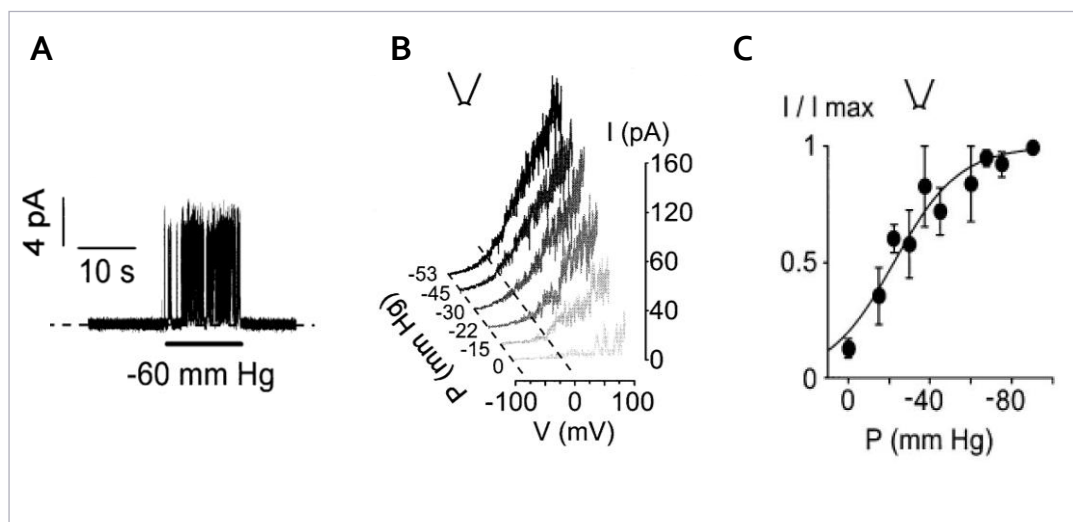


Figure 14 : TREK-1 est un canal mécanosensible. A. Activation réversible de TREK-1 par l'étirement membranaire. Enregistrement patch clamp en cellule attachée maintenue à +50mV. B. Effets de l'augmentation de la stimulation mécanique. Courbes courant/potentiel (I/V) de l'activation de TREK-1 par une pression négative croissante en configuration inside-out. C. Courbe dose-réponse de l'activation de TREK-1 par l'étirement membranaire. Courbes correspondant à l'expérience présentée en B., ratio normalisé de l'amplitude moyenne du courant (I/I_{\max}). Modifiée d'après Patel et al. 1998.

c. Thermosensibilité

Une augmentation progressive de la température induit une augmentation graduelle et réversible des courants TREK-1 (Maingret et al., 2000a) (Figure 15). Le courant augmente environ de 0,9 fois à chaque degré ($Q_{10} \approx 9$) et la sensibilité maximale du canal à la température est observée entre 32°C et 37°C (Maingret et al., 2000a). Au-delà d'un maximum d'activation à 42°C, l'activité du canal diminue progressivement. Le domaine C-terminal de TREK-1 joue un rôle essentiel dans cette modalité (Bagriantsev et al., 2012; Maingret et al., 2000a). La délétion partielle de la région C-terminale de TREK-1, ou son remplacement par le domaine d'un autre canal K_{2P} insensible à la température, abolit la thermosensibilité (Maingret et al., 2000a). Le changement de configuration du domaine C-terminal par la température pourrait être transmis, via le TM4 et le P1, à la porte de type C extracellulaire du canal (Bagriantsev et al., 2012). Le domaine C-terminal est donc un modulateur essentiel des sensibilités mécaniques et thermiques de TREK-1. Par contre, contrairement à la sensibilité mécanique, la sensibilité thermique de TREK-1 nécessite l'intégrité cellulaire puisqu'elle est perdue en enregistrement de patch excisé sur canal unitaire (Maingret et al., 2000a). Il n'est donc pas certain que la thermo-sensibilité de TREK-1 soit une propriété inhérente au canal mais elle pourrait nécessiter l'interaction avec un partenaire protéique.

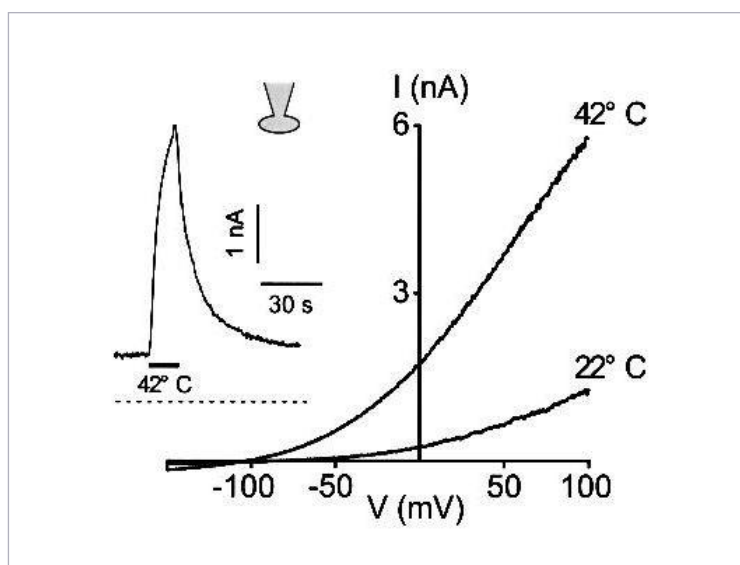


Figure 15 : TREK-1 est un canal thermosensible. Courbes I/V de cellules COS transfectées avec TREK-1. Des rampes de voltage de 800ms sont appliquées à partir d'un potentiel de maintien de -80mV. Les courants sont enregistrés à 22°C et 42°C. L'insert représente le courant induit par le changement de température de 22°C à 42°C (barre) à 0mV et pour des concentrations de potassium physiologiques. D'après Maingret et al., 2000.

d. Modulation par les lipides cellulaires

TREK-1 est activé de façon graduelle et réversible par les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique (AA) (Patel et al., 1998, 2001). On observe toujours cette activation en patch excisé et en présence d'inhibiteurs de lipoxygénase et de cyclooxygénase ce qui laisse supposer que cet effet est direct et indépendant du métabolisme de l'AA (Patel et al., 2001). Pour pouvoir activer TREK-1, les acides gras doivent avoir un haut degré d'insaturation, une longue chaîne et être une tête polaire chargée négativement (Patel et al., 1998). Le segment initial du domaine C-terminal du canal est essentiel à l'activation de TREK-1 par l'AA. Le mécanisme d'action pourrait être commun à celui de l'activation mécanique mais l'existence d'un site spécifique de liaison des acides gras, notamment au niveau des TM, ne peut pas être complètement écartée (Miller and Long, 2012; Patel et al., 1998, 2001). Cet effet des acides gras polyinsaturés sur TREK-1 a une relevance physiologique importante car il a été montré que TREK-1 était impliqué dans la neuroprotection induite par ces acides gras (Heurteaux et al., 2004; Lauritzen et al., 2000).

Le canal TREK-1 est également activé par les lysophospholipides extracellulaires à longue chaîne hydrophobe et large tête polaire comme la lysophosphatidylcholine (LPC) (Maingret et al., 2000b). Ceux-ci n'ont pas d'effet direct sur TREK-1 car ils n'ont plus d'effet en patch excisé ou lorsqu'ils sont appliqués sur le demi-feuillet interne de la membrane.

Les phospholipides membranaires comme le PIP_2 et la phosphatidylsérine sont également des activateurs de TREK-1 (Chemin et al., 2005a, 2007; Lopes et al., 2005). L'activité du canal serait régulée par une interaction entre un motif polybasique de son domaine C-terminal et PIP_2 qui est très abondant dans le feuillet interne de la membrane plasmique (Chemin et al., 2005b; Sandoz et al., 2011). L'hydrolyse de PIP_2 membranaire en diacylglycérol (DAG) par la PLC inhibe TREK-1 (Chemin et al., 2005a, 2007; Lopes et al., 2005). Il a été proposé que cette inhibition serait due à une baisse de la concentration de PIP_2 (Chemin et al., 2003) et à la perte de liaison entre le domaine C-terminal de TREK-1 et la membrane plasmique (Sandoz et al., 2011).

e. Sensibilité au pH

Une diminution du pH intracellulaire convertit l'activité faible du canal TREK-1 en de forts courants de fuite qui sont insensibles à l'AA, à l'étirement membranaire et à la phosphorylation (Honoré et al., 2002). Il a été montré que c'est la protonation d'un résidu d'acide glutamique (E306) situé dans le domaine C-terminal du canal qui est responsable de leur activation par le pH acide (Honoré et al., 2002). Ce résidu se situe dans la région contenant cinq résidus basiques qui interagissent avec la membrane plasmique (cités précédemment).

TREK-1 est également sensible aux variations du pH extracellulaire (Cohen et al., 2008; Sandoz et al., 2009). Une acidification du milieu extracellulaire inhibe fortement le courant TREK-

1 alors qu'une alcalinisation le potentialise. Cette sensibilité est portée par une histidine (H126) située dans la boucle extracellulaire TM1P1.

f. Modulation par les neurotransmetteurs

La stimulation de récepteurs couplés aux protéines G_s et G_q trimériques comme les récepteurs sérotoninergiques 5HT, les récepteurs à l'orexine et à l'angiotensine II et les récepteurs au glutamate mGluR1 et mGluR5 inhibe TREK-1 (Chemin et al., 2003; Enyeart et al., 2005; Murbartián et al., 2005). À l'inverse, la stimulation de récepteurs couplés à la protéine G_i comme mGluR2 et mGluR4, qui diminue la concentration d'AMPc et l'activité de la PKA, active TREK-1 (Cain et al., 2008; Mathie, 2007). G_s et G_q inhibent indirectement TREK-1 via la phosphorylation de résidus sérine (S333 et S300) de leur domaine C-terminal par la PKA et la PKC (Chemin et al., 2003; Mathie, 2007; Murbartián et al., 2005). La phosphorylation de la sérine S333 par la PKA est nécessaire à la phosphorylation de la sérine S300 par la PKA ou la PKC (Murbartián et al., 2005) ce qui laisse supposer qu'il existe une interaction entre les deux sites de phosphorylation et un rôle prépondérant de la PKA pour la régulation du canal.

Il a récemment été montré que le canal TREK-1 peut interagir directement avec les protéines $G_{\beta\gamma}$, mécanisme qui serait impliqué dans la libération de glutamate par les astrocytes (Woo et al., 2012)

g. Modulation par le cytosquelette

Le canal TREK-1 est inhibé par le cytosquelette d'actine (Lauritzen et al., 2005). Le traitement de cellules avec des agents qui déstabilisent le cytosquelette d'actine augmente le nombre de canaux TREK-1 actifs (Honoré et al., 2006; Lauritzen et al., 2005; Patel et al., 1998). Cela suggère que le cytosquelette d'actine inhibe le canal TREK-1 de façon tonique et réduit l'activation par les tensions membranaires (Lauritzen et al., 2005; Patel et al., 1998). Parallèlement, TREK-1 a un effet important sur l'organisation du cytosquelette d'actine et facilite la formation de filopodes. Il existe donc une interaction dynamique entre TREK-1 et le cytosquelette d'actine dont les bases moléculaires ne sont pas encore totalement résolues. Néanmoins, il a été montré que la sérine S333, site de phosphorylation de la PKA, et le glutamate E306 identifié comme le senseur de proton de TREK-1, qui se trouvent tous deux dans le domaine C-terminal, sont nécessaires à cette interaction (Lauritzen et al., 2005).

h. Partenaires protéiques

L'activité du canal TREK-1 est donc modulée par un grand nombre de stimuli physiques, chimiques et pharmacologiques. Des approches protéomiques ont également mis en évidence des partenaires protéiques qui interviennent dans la régulation du canal.

La protéine d'ancrage AKAP-150 (A Kinase Anchoring Protein 150) est connue pour son rôle dans l'organisation de complexes de signalisation dans les neurones (Welch et al., 2010). Elle interagit avec la PKA et la PKC, la protéine phosphatase 2B, les protéines post-synaptiques PSD95

et SAP97 ainsi qu'avec des canaux ioniques et des récepteurs membranaires. Des expériences d'immunoprécipitation et d'analyses de spectrométrie de masse ont montré qu'AKAP-150 se lie au canal TREK-1 au niveau du cluster de charges positives de son domaine C-terminal intracellulaire, entre V298 et R311 (Sandoz et al., 2006) (Figure 16). Le canal TREK-1 associé à AKAP-150 est constitutivement activé et n'est plus régulé par un stimulus mécanique, l'AA ou un pH acide intracellulaire. Ces différentes voies de régulation du canal mettent toutes en jeu le cluster de charges auquel se lie AKAP-150. TREK-1 peut cependant toujours être régulé par les protéines kinases lorsqu'il est lié à la protéine AKAP-150. La cinétique de l'inhibition par les récepteurs couplés à la protéine G_q est beaucoup plus rapide, démontrant son implication dans la phosphorylation de TREK-1 par la PKA. Associé à AKAP-150, TREK-1 est donc moins régulé mais il génère des courants de fuite plus importants qui modifient l'excitabilité des cellules qui l'expriment (Sandoz et al., 2006).

La même méthodologie expérimentale a permis d'identifier la protéine Mtap2 (Microtubule-associated protein 2, ou MAP2) comme un second partenaire protéique de TREK-1 (Sandoz et al., 2008). Mtap2 est une protéine d'ancrage pour des complexes de signalisation dans les dendrites et les épines dendritiques. Mtap2 est également présente dans les cônes de croissance. Le site de fixation de Mtap2 sur TREK-1 est situé dans le domaine C-terminal dans une région contenant quatre résidus chargés positivement (K342, K347, R348 et K349) (Figure 16). C'est un site distinct du site de fixation d'AKAP-150 et les deux protéines pourraient se lier simultanément sur TREK-1 (Sandoz et al., 2008). Mtap2 ne modifie pas l'activité du canal mais augmente la densité des canaux à la membrane, ce qui nécessite la liaison simultanée de Mtap2 à TREK-1 et à la tubuline. Les effets de la fixation d'AKAP-150 et de Mtap2 sur le canal sont additifs, plaçant TREK-1 au centre d'un complexe protéique dynamique impliquant des éléments du cytosquelette et des protéines kinases (Noël et al., 2011; Sandoz et al., 2006).

Une interaction entre le domaine N-terminal du canal TREK-1 et une sous-unité du complexe de manteau protéique 1 (COP1), la β COP, a été démontrée par double hybride chez la levure puis confirmée *in vivo* et *in vitro* dans des lignées cellulaires (Kim et al., 2010). Le complexe COP1 est impliqué dans la formation de vésicules Golgiennes de transports rétrograde et antérograde de protéines membranaires, notamment certains canaux K2P, TASK-1 et TASK-3 (Mathie et al., 2010; O'Kelly et al., 2002; Zuzarte et al., 2009). Alors que la liaison entre β COP et les canaux TASK a lieu au niveau de l'appareil de Golgi et induit la rétention de ces canaux dans le réticulum endoplasmique, l'interaction entre β COP et TREK-1 se ferait au niveau de la membrane plasmique où il y a colocalisation des partenaires. L'expression de β COP augmente la densité de courant et l'expression à la membrane des canaux TREK-1. Ceci suggère que cette interaction facilite le transport antérograde de TREK-1 à la membrane plasmique (Kim et al., 2010). Cette interaction montre pour la première fois l'implication du domaine N-terminal dans la régulation du canal TREK-1 (Figure 16).

Le récepteur à la neurotensine 3 (NTSR3, aussi appelé gp95 ou sortiline) a récemment été impliqué dans le trafic intracellulaire du canal TREK-1 (Mazella et al., 2010). La majorité de la protéine NTSR3 est localisée dans l'appareil de Golgi où NTSR3 est impliqué dans le trafic de protéines. NTSR3 est également retrouvé à la membrane plasmique où il joue le rôle de récepteur ou de corécepteur à la neurotensine. NTSR3 se lie directement à TREK-1 dans l'appareil de Golgi et augmente l'expression de TREK-1 à la membrane et la densité de courant portée par TREK-1 (Mazella et al., 2010). La maturation post-traductionnelle du domaine N-terminal extracellulaire de NTSR3 libère un propeptide de 44 acides aminés qui se fixe au complexe NTSR3/TREK-1 et déclenche l'endocytose du canal (Mazella et al., 2010).

La spadin, que nous avons citée précédemment comme un bloqueur spécifique de TREK-1, est un peptide synthétique dérivé du pro peptide de NTSR3 qui se lie sur le complexe NTSR3-TREK-1 et provoque l'endocytose du canal (Mazella et al., 2010).

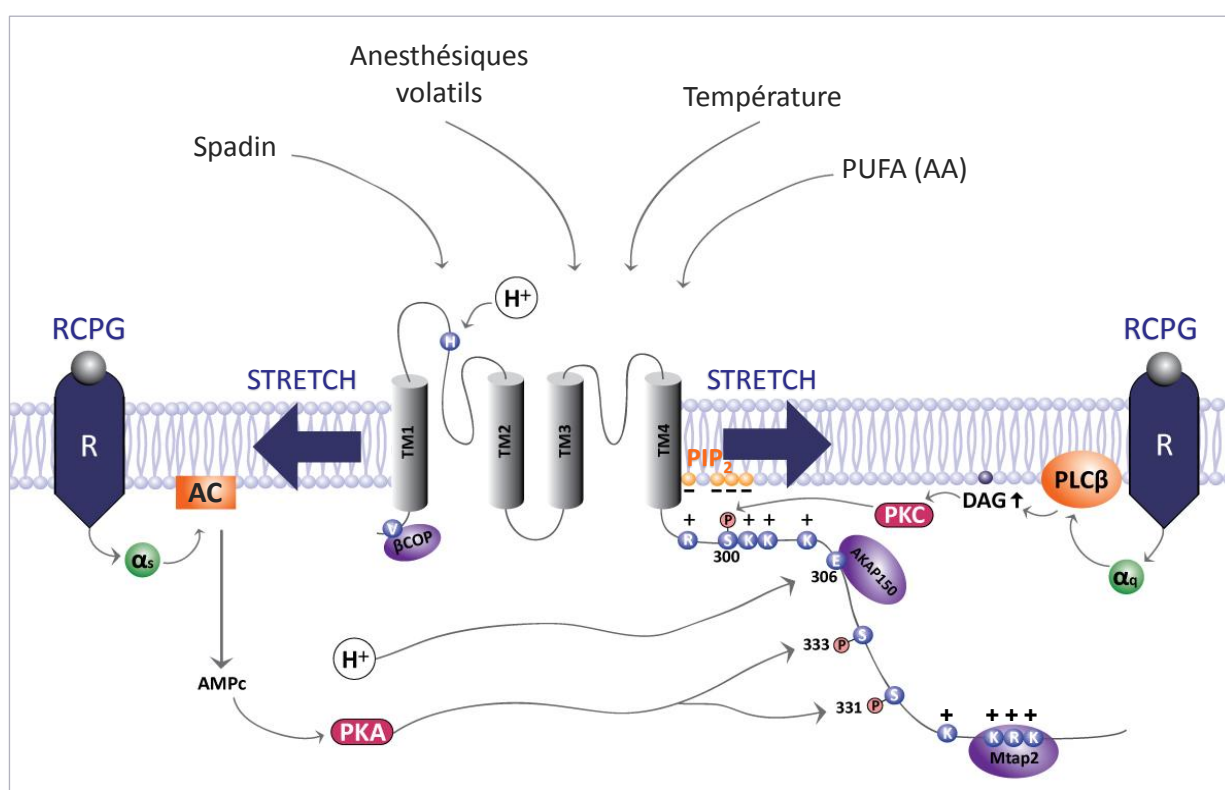


Figure 16 : Régulations et partenaires protéiques du canal TREK-1. TREK-1 est activé par les changements physicochimiques tels que l'étirement membranaire ou la déformation de la membrane plasmique, la température, et l'acidose intracellulaire. Une acidose extracellulaire, à l'inverse, inhibe TREK-1. Les acides gras polyinsaturés (PUFA) dont l'acide arachidonique (AA) et une large gamme d'anesthésiques volatils activent également TREK-1. L'activation des voies de signalisation Gs/Adénylate Cyclase/AMPc/PKA et Gq/PLC/DAG/PKC inhibent TREK-1 par la phosphorylation de résidus sérine de l'extrémité C-terminale (S300, S333 et S351). La spadin bloque également l'activité de TREK-1. Les protéines AKAP150 et Mtap2, deux partenaires protéiques du canal, se fixent sur le domaine C-terminal du canal. Le cluster de charges positives retrouvé dans cette région est un élément clé de la modulation du canal, il permet entre autre, une interaction avec la membrane plasmique via le PIP2. La βCOP quant à elle, se lie au niveau de l'extrémité N-terminale. Modifiée d'après Enyedi and Czirják, 2010 et Noël et al., 2011.

3. Rôles physiologiques : étude des souris KO

Les souris invalidées pour le gène TREK-1 (TREK-1^{-/-}) ont été essentielles pour l'étude du rôle physiologique du canal. L'invalidation du gène a été réalisée par recombinaison homologe et a généré des souris en bonne santé, fertiles et sans anomalies morphologiques visibles (Heurteaux et al., 2004). L'analyse approfondie de leurs phénotypes a permis de révéler l'implication de TREK-1 dans diverses fonctions physiologiques telles que l'anesthésie générale, la neuroprotection, la dépression et la perception douloureuse, la vasodilatation (Gardener et al., 2004; Goonetilleke and Quayle, 2012), la régulation du rythme cardiaque (Kelly et al., 2006; Li et al., 2006; Terrenoire et al., 2001), ainsi que la contraction du muscle utérin (Buxton et al., 2010; Monaghan et al., 2011).

a. TREK-1 et anesthésie générale

L'activation de TREK-1 par les anesthésiques généraux volatils induit une hyperpolarisation des cellules (Patel et al., 1999). Les souris TREK-1^{-/-} sont significativement moins sensibles que les souris sauvages à plusieurs anesthésiques volatils, tels que l'halothane et le chloroforme (Franks and Honoré, 2004; Heurteaux et al., 2004; Patel et al., 1999). En effet, les souris KO sont insensibles à une concentration d'halothane qui est suffisante à anesthésier 100% de souris sauvage (Heurteaux et al., 2004). Elles restent néanmoins sensibles aux anesthésiques mais à des doses plus importantes, ce qui est vraisemblablement du fait du peu de sélectivité des anesthésiques volatils, et par exemple de la sensibilité d'autres canaux K_{2P} aux anesthésiques comme les canaux TASK. Ces études démontrent que l'activation du canal TREK-1 contribue aux mécanismes cellulaires de l'anesthésie générale.

b. TREK-1 et neuroprotection

Les souris TREK-1^{-/-} sont plus susceptibles de développer une ischémie ou de l'épilepsie par rapport aux souris sauvages (Franks and Honoré, 2004; Heurteaux et al., 2004). Si on induit des crises épileptiques par injection de kaïnate, un activateur des récepteurs glutamatergiques, ou de pentylenetrazol, un inhibiteur des récepteur GABA, le taux de mortalité des souris KO est considérablement supérieur à celui des souris sauvages. De même, le taux de mortalité des souris TREK-1^{-/-} après induction d'ischémies cérébrales bilatérales ou d'ischémies de la moelle épinière est nettement supérieur à celui des souris sauvages.

Une injection intracérébroventriculaire (ICV) ou intraveineuse (IV) d'acide linoléique ou de lysophosphatidylcholine a un effet neuroprotecteur contre l'ischémie globale et les crises induites par le kaïnate (Blondeau et al., 2002; Lang-Lazdunski et al., 2003; Lauritzen et al., 2000). Cet effet est perdu chez les souris TREK-1^{-/-} (Franks and Honoré, 2004; Heurteaux et al., 2004) indiquant que TREK-1 est essentiel à l'effet neuroprotecteur des lipides polyinsaturés. Dans ces conditions physiologiques et physiopathologiques, l'activité hyperpolarisante inhibitrice de TREK-1 pourrait avoir un effet neuroprotecteur. L'absence du canal chez les souris TREK-1^{-/-} les rend plus

vulnérables à l'épilepsie et l'ischémie cérébrale. TREK-1 est également activé par de nombreuses molécules ayant un effet neuroprotecteur comme le Riluzole, l'oxyde nitrique et le xénon (Duprat et al., 2000; Gruss et al., 2004).

c. TREK-1 et dépression

Les souris TREK-1^{-/-} ne présentent pas de défaut majeur de leurs réflexes ou fonctions cognitives (Heurteaux et al., 2004, 2006). Par contre TREK-1 semble jouer un rôle essentiel dans le contrôle de l'humeur (Heurteaux et al., 2006). En effet, les souris TREK-1^{-/-} présentent une neurotransmission par la sérotonine accrue et une résistance à la dépression. Dans des tests comportementaux évaluant l'état dépressif des animaux, les souris KO ont le même comportement que des souris sauvages traitées par un antidépresseur comme la fluoxétine. TREK-1 est inhibé par les récepteurs de la sérotonine qui est le neurotransmetteur impliqué dans les phénomènes de dépression et par la fluoxétine qui est un antidépresseur de référence (Kennard et al., 2005; Patel et al., 1998). Le traitement des souris TREK-1^{-/-} n'a d'ailleurs pas d'effet, ce qui suggère que l'action de cette molécule passe par l'inhibition de TREK-1. Ce phénotype est cohérent avec les régulations connues de TREK-1 et son pattern d'expression cérébrale. TREK-1 est fortement exprimé dans les neurones sérotoninergiques du raphé et dans plusieurs zones cérébrales impliquées dans la dépression et dans la gestion des émotions comme le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hypothalamus (Heurteaux et al., 2006). De plus, TREK-1 a donc un rôle majeur dans la dépression ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de cette pathologie.

d. TREK-1 et perception douloureuse

Le canal TREK-1 est modulé par des stimuli douloureux, mécaniques et thermiques. TREK-1 est exprimé dans les neurones sensoriels de DRG de petit et moyen diamètre où il co-localise avec le canal TRPV1, un marqueur des nocicepteurs (Alloui et al., 2006; Maingret et al., 2000a; Talley et al., 2001). Il était donc logique d'étudier le comportement douloureux des souris invalidées pour TREK-1 afin d'évaluer l'implication du canal dans la nociception.

Les souris TREK-1^{-/-} sont plus sensibles à une augmentation de la température et leur seuil de sensibilité thermique est significativement abaissé par rapport aux souris sauvages (Alloui et al., 2006) (Figure 17C). L'étude de la thermo-sensibilité des fibres nociceptives isolées de souris TREK-1^{-/-} par la technique de nerf-peau a montré que leur réponse à une augmentation de la température de 30°C à 50°C est plus prononcée que celle des fibres de souris sauvages (Alloui et al., 2006) (Figure 17A et B). L'absence du canal TREK-1 augmente la fraction de fibres sensibles au chaud (Noël et al., 2009). Par contre, l'absence de TREK-1 ne semble pas avoir d'impact sur la sensibilité au froid des souris TREK-1^{-/-} puisque leur réponse à un test d'acétone n'est pas affectée.

Les souris TREK-1^{-/-} présentent également une allodynie mécanique, c'est-à-dire que des stimuli mécaniques qui sont normalement non douloureux pour une souris sauvage deviennent douloureux pour les souris KO (Alloui et al., 2006).

En conditions inflammatoires, on observe une sensibilisation des nocicepteurs dans laquelle le canal TRPV1 joue un rôle central (cf. introduction partie 2). Cette sensibilisation implique des médiateurs inflammatoires comme le PGE₂, qui sensibilise TRPV1 via une voie PKA/PKC-dépendante (Moriyama et al., 2005). L'injection de carragénine dans la patte de l'animal, provoque une inflammation et induit chez les souris sauvages une hypersensibilité thermique (au chaud) et mécanique qui est réduite chez les souris TREK-1^{-/-} (Alloui et al., 2006). TREK-1 semble donc jouer un rôle conséquent dans la sensibilisation des nocicepteurs pendant l'inflammation. Il est également intéressant de noter que le traitement chimiothérapique par l'oxaliplatine, qui induit une importante hypersensibilité au froid, réprime l'expression du canal TREK-1 (Descœur et al., 2011). Cela suggère que la diminution de l'expression de TREK-1 est en partie responsable de l'hyperalgésie au froid produite par l'agent anticancéreux.

L'ensemble de ces résultats établissent l'implication du canal TREK-1 dans la nociception mécanique et thermique. TREK-1 apparaît comme un important modulateur de l'activité des nocicepteurs, très certainement en s'opposant à leur dépolarisation par l'ouverture de canaux excitateurs comme les canaux TRP.

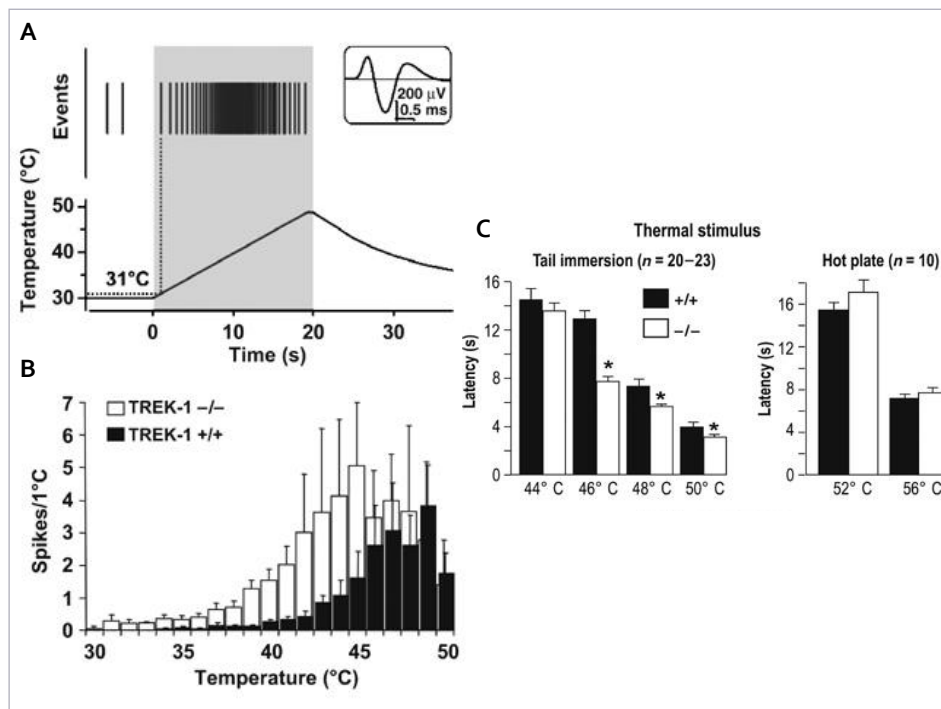


Figure 17 : Implication du canal TREK-1 dans la perception douloureuse. A. Enregistrement représentatif de la réponse de fibres C nociceptives TREK-1^{-/-} à une rampe chaude. Le panel du haut montre la décharge de potentiels d'action d'une fibre C-MH en réponse à une rampe chaude de 30°C à 50°C (panel bas). B. Réponses moyennes des fibres C-MH sauvages (TREK-1^{+/+}, blanc) et KO (TREK-1^{-/-}, noir). Les PA sont groupés par 5 degrés. C. Comparaison des comportements douloureux de souris TREK-1^{+/+} (blanc) et TREK-1^{-/-} (noir). Latences de retrait de la queue (gauche) et de léchage de la patte (droite) en réponse à un stimulus thermique nocif. D'après Alloui et al., 2006.

En plus des rôles que nous venons d'aborder, le canal TREK-1 contribue également à la vasodilatation (Gardener et al., 2004; Goonetilleke and Quayle, 2012), à la régulation du rythme cardiaque (Kelly et al., 2006; Li et al., 2006; Terrenoire et al., 2001), ainsi qu'à la contraction du muscle utérin (Buxton et al., 2010; Monaghan et al., 2011).

B. Le canal TRAAK

Le canal TRAAK est composé de deux sous-unités de 398 acides aminés chez la souris et de 393 acides aminés chez l'homme (Fink et al., 1996; Lesage et al., 2000b). Il présente 69% d'homologie avec le canal TREK-1 et sa topologie est similaire aux autres canaux de la famille des K2p (Brohawn et al., 2012). Son domaine C-terminal intracellulaire est plus long que celui de TREK-1 et c'est d'ailleurs la région qui comporte le moins d'homologie avec les autres canaux TREK-1 et TREK-2 (Brohawn et al., 2012; Fink et al., 1998).

L'expression de TRAAK se limite essentiellement au système nerveux, placenta, testicules et aux cellules musculaires lisses de la paroi utérine (Fink et al., 1998; Lesage et al., 2000b; Medhurst et al., 2001; Talley et al., 2001; Tichenor et al., 2005). Il est faiblement exprimé dans l'embryon mais son expression augmente après la naissance (Aller and Wisden, 2008). Chez l'adulte, dans le système nerveux, TRAAK est majoritairement exprimé dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, les noyaux caudés, le cervelet, la moelle épinière et la rétine (Fink et al., 1998; Medhurst et al., 2001; Talley et al., 2001). Tout comme TREK-1, le canal TRAAK est largement exprimé dans le système nerveux périphérique et en particulier dans les neurones sensoriels de DRG et des ganglions trijumeaux (Medhurst et al., 2001), ainsi que dans les afférences vagales (Zhao et al., 2010).

Chez l'homme, deux isoformes de TRAAK ont été rapportées : TRAAKa composée de 393 acides aminés et TRAAKb qui présente une extension de 26 acides aminés du domaine N-terminal (Lesage et al., 2000b; Ozaita and Vega-Saenz de Miera, 2002). Une version tronquée du canal composée uniquement de 67 acides aminés, TRAAKt, a été identifiée (Fink et al., 1998). Elle est identique à l'isoforme murine des résidus 1 à 63, ce qui comprend le domaine TM₁ et la première partie de la boucle extracellulaire TM₁P₁. Le domaine P manquant étant nécessaire à la dimérisation et à l'intégrité du pore du canal, il est peu probable que ce variant puisse former un canal fonctionnel. TRAAKt ne semble pas interférer avec l'isoforme fonctionnelle du canal, alors que le niveau d'expression quasiment identique suggère un rôle de cette forme tronquée, qui pour l'instant reste inconnu (Fink et al., 1998).

1. Propriétés électrophysiologiques

Exprimé dans un système d'expression hétérologue, le canal TRAAK génère des courants instantanés qui ne s'inactivent pas et qui sont indépendants du potentiel de membrane (Fink et al., 1998). Ils présentent une rectification sortante qui, contrairement aux courants TREK-1 disparaît en concentrations symétriques de potassium. La conductance unitaire du canal est

d'environ 45pS (Fink et al., 1998). Tout comme TREK-1, le canal TRAAK est caractérisé par un flickering important, et il hyperpolarise le potentiel membranaire des cellules qui l'expriment à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium (Fink et al., 1998).

2. Régulations et partenaires protéiques

Le canal TRAAK tient son nom de sa forte sensibilité aux acides gras polyinsaturés et en particulier l'AA (Fink et al., 1998) (Figure 18). L'AA induit une stimulation drastique des courants TRAAK, sans modification de leur cinétique, qui est dose-dépendante, réversible et effective à tous les potentiels de membrane. Comme TREK-1, les canaux TRAAK sont activés par les lysophospholipides membranaires (Maingret et al., 2000b) ainsi que par les phospholipides membranaires tel que le PIP2 (Lopes et al., 2005) et ils sont insensibles aux acides gras saturés (Fink et al., 1998).

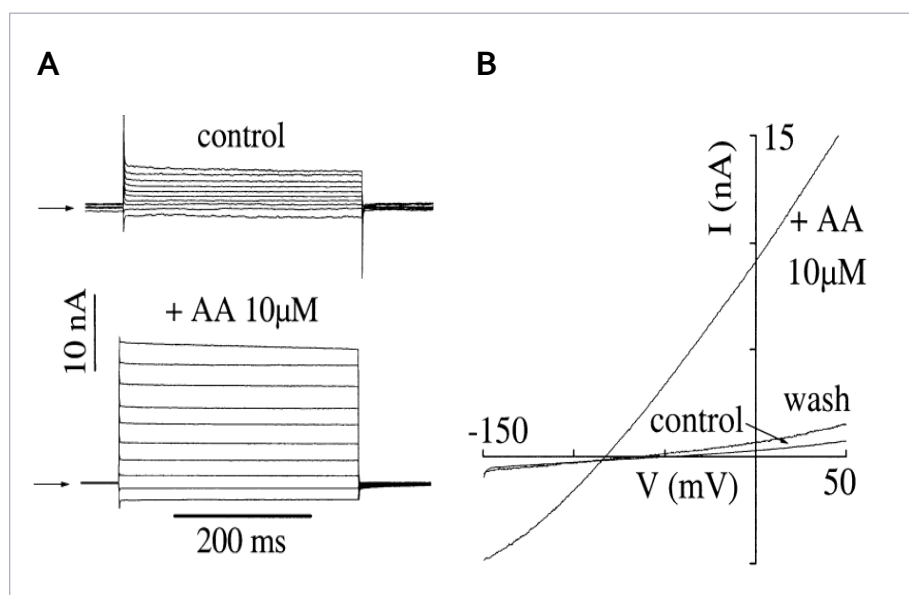


Figure 18 : TRAAK est activé par les acides gras. A. Stimulation du canal par l'acide arachidonique (AA). Courants TRAAK avec ou sans AA 10μM. Enregistrements en configuration cellule entière de cellules COS transfectées. **B. Activation réversible de TRAAK par l'AA.** Courbes I/V obtenues par application de rampes de voltage avant (control), après 3min de perfusion d'AA 10μM et après rinçage (wash). D'après Fink et al., 1998.

Comme les canaux TREK-1, les canaux TRAAK ne sont pas inhibés par les bloqueurs classiques des canaux potassiques comme le TEA et la 4-AP (Fink et al., 1998). Le Riluzole active de façon réversible et durable les canaux TRAAK, alors qu'il n'active les canaux TREK-1 que de façon transitoire (Duprat et al., 2000). Cette différence résulte de l'absence de régulation des canaux TRAAK par phosphorylation par la PKA, alors que la PKA est elle-même activée par le Riluzole (Duprat et al., 2000). Le canal TRAAK est insensible à une acidification du milieu extracellulaire par contre, il est activé par une alcalinisation (Kim et al., 2001). Les anesthésiques locaux et généraux qui inhibent TREK-1 n'ont pas d'effet sur le canal TRAAK et il en est de même

pour la PKA et la PKC et donc, par extension, pour les récepteurs couplés aux protéines G (Fink et al., 1998; Mathie, 2007). Les partenaires protéiques du canal TREK-1 comme l'AKAP150 ou Mtap2 n'interagissent pas avec TRAAK (Sandoz et al., 2006, 2008). Comme indiqué précédemment, le domaine C-terminal du canal TREK-1 est indispensable à un grand nombre de modulation de l'activité du canal ainsi qu'à son interaction avec ses différents partenaires protéiques. Le domaine C-terminal de TRAAK ne présente que 50% d'identité avec celui de TREK-1 ce qui expliquerait les divergences de modulations observées entre les deux canaux (Kim et al., 2001).

Malgré cela, le canal TRAAK partage avec TREK-1 sa sensibilité à l'étirement membranaire (Maingret et al., 1999b). Une courbure convexe de la membrane plasmique active le canal (Figure 19A). Cet effet est conservé en patch excisé. TRAAK, comme TREK-1, est donc probablement directement activé par la bicouche lipidique en l'absence de tous les autres composants cellulaires (Brohawn et al., 2014). Le trinitrophénol, un agent créateur, active également le canal tandis qu'une déformation concave de la membrane n'a pas d'effet. Le canal TRAAK semble donc spécifiquement activé par une déformation convexe de la membrane (Maingret et al., 1999b) (Figure 19B). La désorganisation du cytosquelette d'actine par l'application de colchicine ou l'excision du patch renforce l'activation mécanique du canal TRAAK, suggérant que le cytosquelette exerce une inhibition tonique sur le canal (Maingret et al., 1999b). Il est intéressant de noter qu'il existe un fort effet synergique du pH alcalin et de l'AA sur la mécanosensibilité de TRAAK (Kim et al., 2001). En effet, l'activation de TRAAK par un étirement de la membrane est décuplée quand elle est couplée à un pH alcalin ou à la présence d'AA.

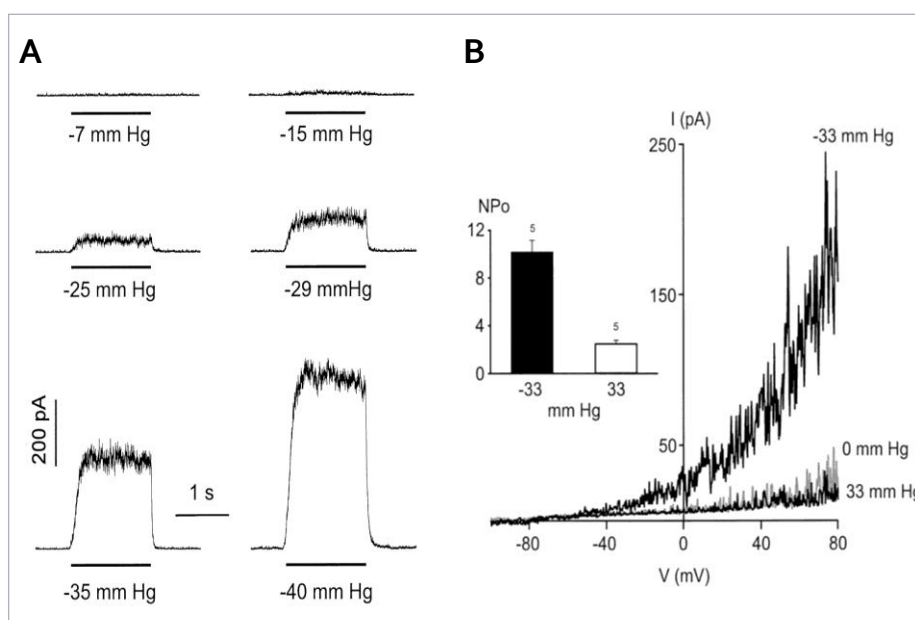


Figure 19 : TRAAK est un canal mécanosensible. A. Activation graduelle et réversible du canal TRAAK par la pression négative. Enregistrements de patch-clamp de cellules COS transfectées, en configuration inside-out. **B. Activation spécifique par une pression négative.** Les courbes I/V montrent que seule la pression négative active le canal. L'insert représente les probabilités d'ouverture du canal (NPo) en fonction de la pression appliquée à la membrane. D'après Maingret et al. 1999b.

Une autre propriété commune entre le canal TRAAK et TREK-1 est sa sensibilité thermique (Kang et al., 2005; Noël et al., 2009). Dans un système d'expression hétérologue, les courants TRAAK sont activés par une augmentation de la température entre 24°C et 42°C (Figure 20), avec un seuil de sensibilité thermique autour de 31°C. Le chaud augmente la fréquence d'ouverture du canal mais aussi réduit son temps d'ouverture (Kang et al., 2005). Cette thermo-sensibilité a également été observée dans des systèmes natifs et en particulier dans les neurones sensoriels de DRG.

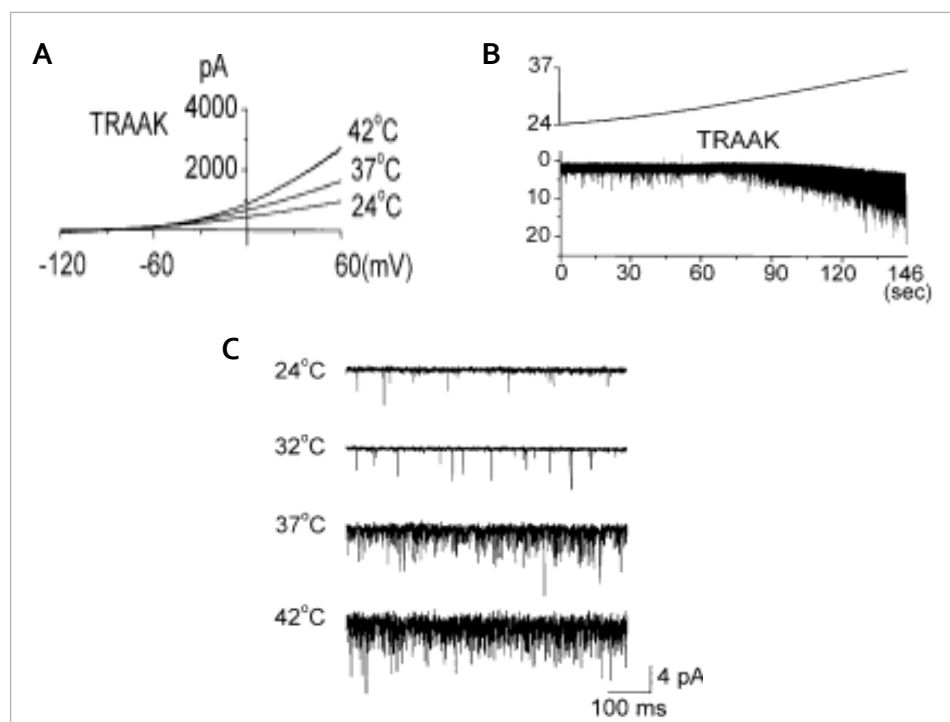


Figure 20 : TRAAK est un canal thermosensible. Augmentation des courants TRAAK en réponse à l'augmentation de la température : cellules COS transfectées, enregistrements en configuration cellule entière (A), cellule attachée (B et C). D'après Kang et al., 2005.

3. Rôles physiologiques : étude des souris KO

C'est grâce à l'utilisation de souris invalidées pour le canal TRAAK (TRAAK^{-/-}) que l'on a pu étudier les rôles physiologiques du canal (Heurteaux et al., 2004). Ces souris ne présentent aucune anomalie morphologique, elles sont en bonne santé et fertiles (Heurteaux et al., 2004; Laigle et al., 2012).

TRAAK est un canal hyperpolarisant et inhibiteur, fortement exprimé dans le SNC, pourtant les souris invalidées pour le canal ne sont pas plus sujettes aux épilepsies ou aux ischémies cérébrales que les souris sauvages (Heurteaux et al., 2004). Une étude récente a cependant montré, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale, que le volume de tissu lésé est moins important chez les souris TRAAK^{-/-} que chez les souris sauvages (Laigle et al., 2012). Après l'induction d'une ischémie cérébrale focale, la microcirculation cérébrale est moins endommagée

chez les souris KO et leur métabolisme et pH cérébraux est préservée en comparaison avec les souris sauvages. Le canal TRAAK pourrait donc être impliqué dans les atteintes tissulaires qui résultent d'une ischémie cérébrale.

L'étude des souris TRAAK^{-/-} a permis de mettre en évidence un rôle du canal dans la perception douloureuse (Noël et al., 2009). Les souris invalidées présentent une hypersensibilité mécanique et thermique (Figure 21C). L'absence du canal TRAAK, chez la souris TRAAK^{-/-}, augmente la proportion de neurones de DRG (Figure 21A) et de fibres C nociceptives sensibles au chaud. L'activité des fibres C en réponse à une augmentation de la température est augmentée (Figure 21B). Les souris TRAAK^{-/-} présentent une hyperalgésie thermique entre 44°C et 50°C (Noël et al., 2009).

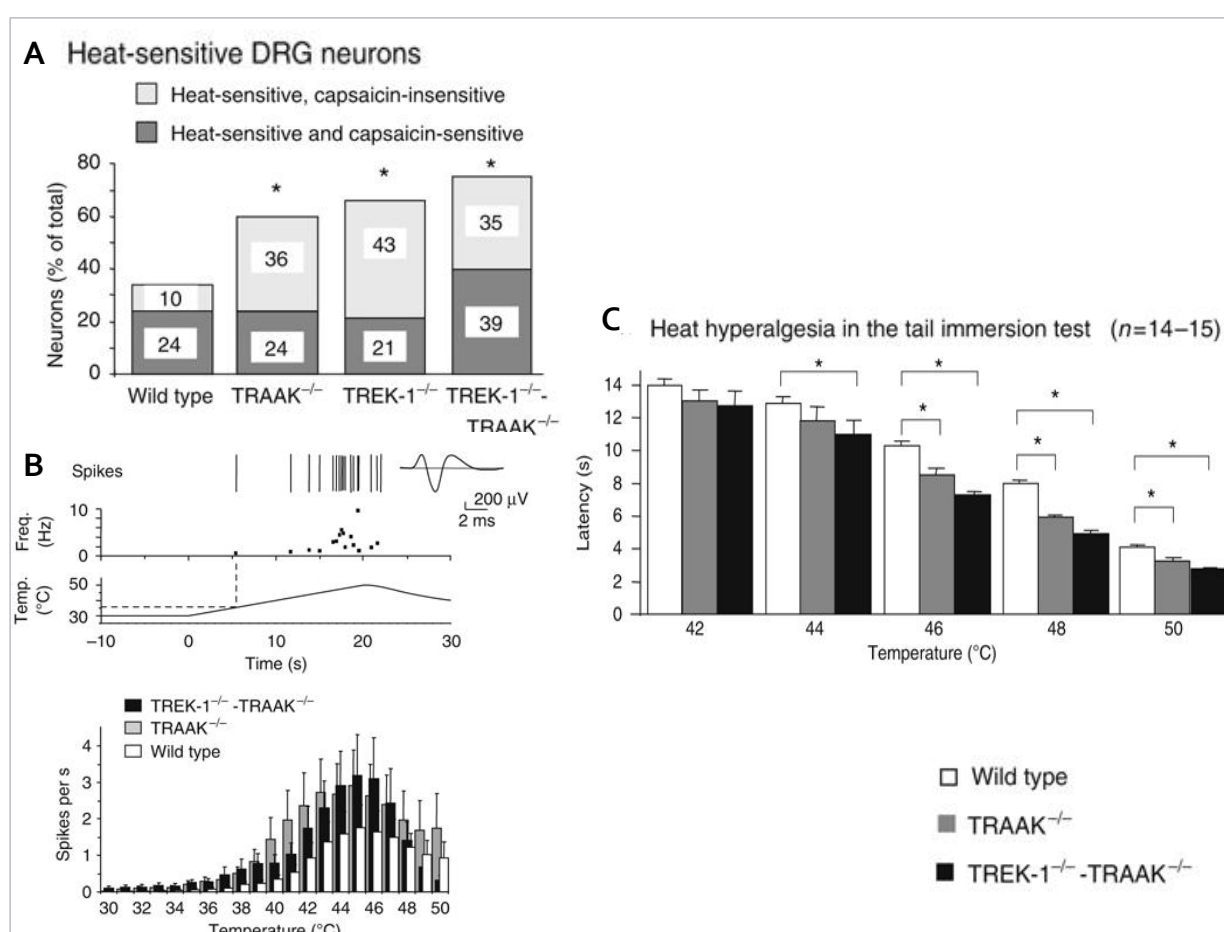


Figure 21 : Implication du canal TRAAK dans la perception du chaud. A. La délétion du canal augmente la fraction de neurones de DRG en culture activés par le chaud. Sensibilité au chaud des neurones de DRG mesurée par imagerie calcique. B. La délétion du canal TRAAK augmente la réponse des fibres C thermosensibles. En haut : enregistrement représentatif de l'activité d'une fibre C TREK-1^{-/-}-TRAAK^{-/-} en réponse à une rampe chaude (technique de nerf-peau) ; en bas : fréquence moyenne de décharge en réponse à l'augmentation de température (Hz) des fibres C sauvages (WT, blanc), TRAAK^{-/-} (gris) et TREK-1^{-/-}-TRAAK^{-/-}. C. Comparaison des comportements douloureux de souris WT, TRAAK^{-/-} (gris) et TREK-1^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Latences de retrait de la queue (gauche) en réponse à un stimulus thermique nocif. Modifiée d'après Noël et al., 2009.

Tout comme les souris TREK-1^{-/-}, les souris invalidées pour TRAAK ne présentent pas d'hypersensibilité au froid. Mais l'étude de souris double KO TREK-1^{-/-} - TRAAK^{-/-} a révélé que la délétion des deux canaux altère la sensibilité des souris aux températures froides (Noël et al., 2009). Chez ces souris on observe une augmentation des fractions de neurones de DRG et de fibres nociceptives sensibles au froid (Figure 22A). L'activité des fibres C sensibles au froid est plus intense en réponse au refroidissement (Figure 22B). Les souris invalidées pour TRAAK ont une hyperalgie thermique entre 20°C et 10°C (Figure 22C).

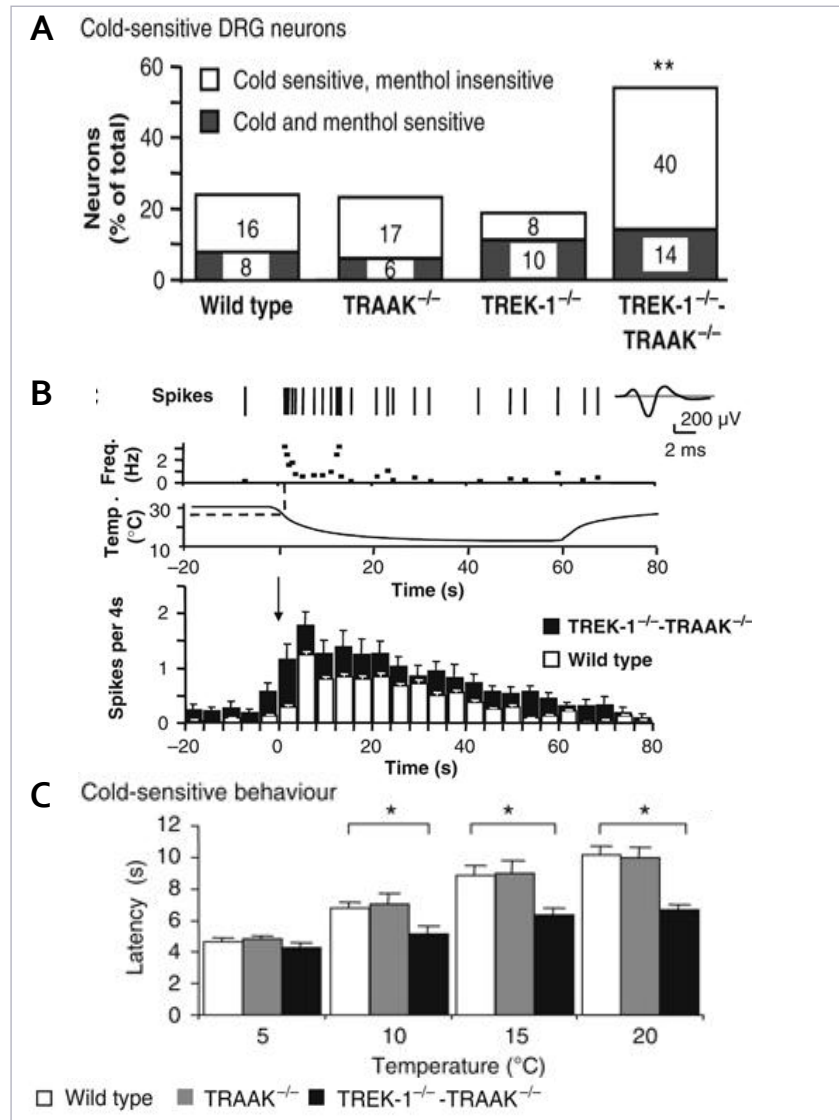


Figure 22 : Implication des canaux TRAAK et TREK-1 dans la perception du froid. **A.** Fraction de neurones de DRG sensibles au froid. Mesurée par imagerie calcique La délétion du canal TRAAK seul ne modifie pas la fraction de neurones de DRG en culture activés par le froid alors que la double délétion de TRAAK et de TREK-1 l'augmente. **B.** Activité des fibres C sensibles au froid. : fréquences moyennes de décharge des fibres C WT (blanc) et TREK-1^{-/-}-TRAAK^{-/-} (noir) en réponse à l'augmentation de température (Hz), mesurée, par la technique de nerf-peau. **C.** Comportement thermique des souris délétées pour TRAAK et/ou TREK-1. Latences d'apparition de signes de douleur en réponse au froid nocif. Modifiée d'après Noël et al., 2009.

Les canaux TREK-1 et TRAAK collaborent donc pour la perception du froid nocif, ce qui laisse supposer que TREK-1 et TRAAK sont coexprimés dans certains neurones sensoriels activés par le froid. TRAAK est également impliqué dans l'hyperalgésie au froid induite par l'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011). Le traitement à l'oxaliplatine diminue l'expression du canal dans les neurones de DRG et les souris invalidées pour TREK-1 et TRAAK ne développent pas d'hypermensibilité au froid comme les souris sauvages.

Le canal TRAAK, seul ou associé avec TREK-1, joue donc un rôle essentiel dans la perception douloureuse thermique et mécanique. Il a été proposé que ces canaux exercent un contrôle thermo-dépendant du potentiel de membrane des neurones sensoriels. Dans des gammes de températures physiologiques, soit entre 17°C et 42°C, TREK-1 et TRAAK sont ouverts et hyperpolarisent la membrane plasmique ce qui inactive les neurones nociceptifs dans cette gamme de températures non douloureuses. Les températures extrêmes, douloureuses, réduisent progressivement l'activité des canaux TREK-1 et TRAAK, diminuant l'importance de ces canaux pour l'hyperpolarisation de la membrane et laissant place à la dépolarisation produite par des canaux thermosensibles excitateurs comme les canaux thermo-TRP (Noël et al., 2009) (Figure 23).

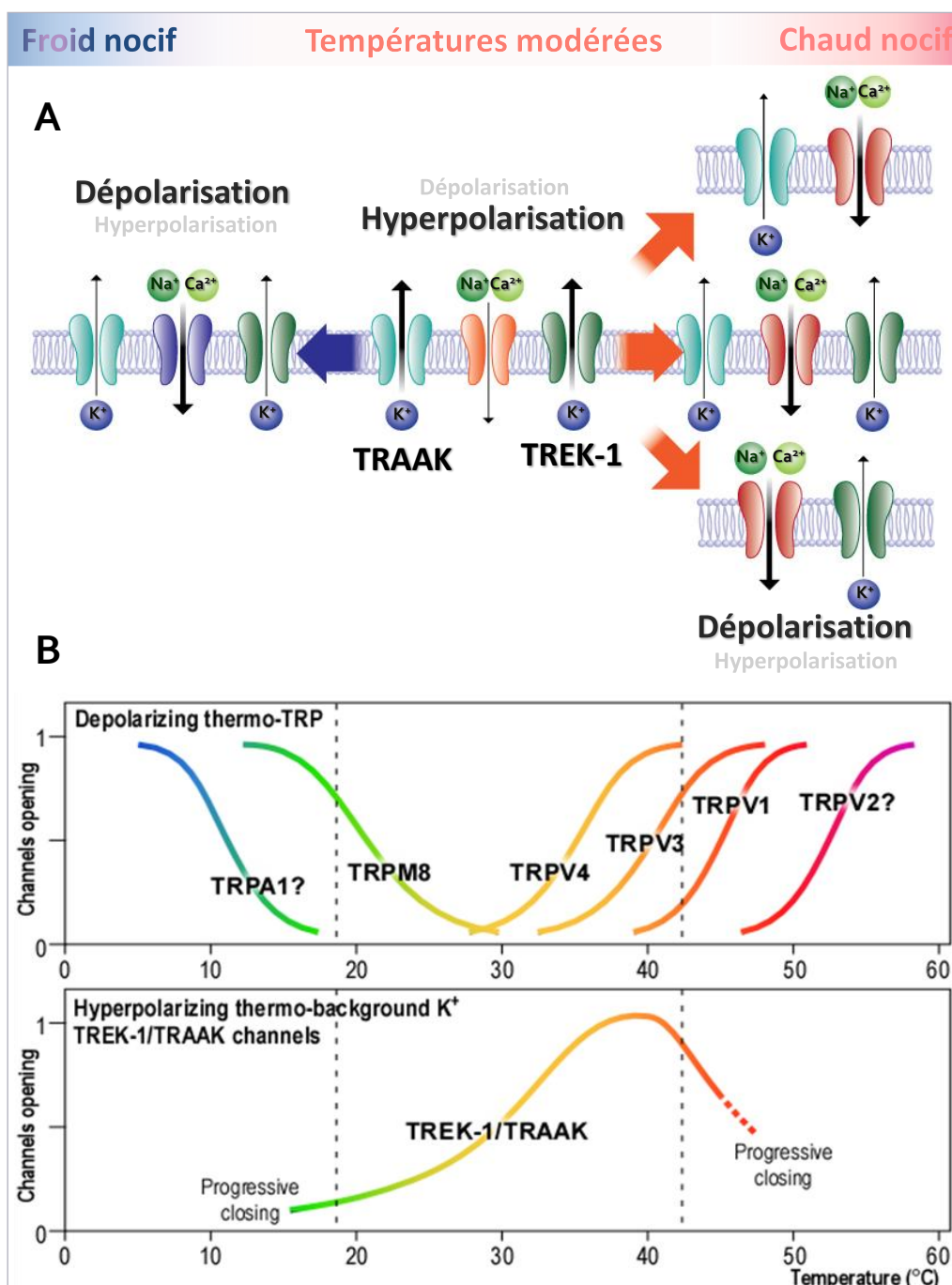


Figure 23 : Rôle des canaux TREK-1 et TRAAK dans la thermo sensibilité des nocicepteurs. A. Modèle de fonctionnement de TREK-1 et TRAAK dans la perception thermique. À des températures physiologiques, les canaux thermosensibles TREK-1 et TRAAK sont ouverts, ils hyperpolarisent la membrane plasmique et impose l'inactivation des nocicepteurs. Les températures extrêmes, chaudes ou froides, causent le déclin progressif de la contribution hyperpolarisante de TREK-1 et TRAAK face à la forte activation de canaux dépolarisants sensibles au chaud ou au froid. Les canaux excitateurs peuvent travailler en association avec TREK-1 ou TRAAK seuls ou avec la combinaison des deux canaux K_{2P} . B. Activité des canaux TREK et TRP en fonction de la température. Le seuil de sensibilité douloureuse (lignes en pointillés) chaud ou froid va dépendre du type d'association entre les canaux excitateurs (probablement les TRP thermosensibles) et les canaux TREK-1 et TRAAK. Modifiée d'après Noël et al., 2009.

C. Le canal TREK-2

Le canal TREK-2 a été identifié comme nouveau membre de la sous-famille de canaux mécano-sensibles TREK en 2000 (Bang et al., 2000). C'est une protéine composée de 538 acides aminés qui présente 63% d'identité et 78% d'homologie avec TREK-1. Il présente un court domaine N-terminal, une grande boucle extracellulaire entre les domaines TM₁ et P₁ et une longue extrémité C-terminale, des propriétés structurales partagées par l'ensemble des canaux K_{2P} (Bang et al., 2000). La principale différence entre TREK-2 et les autres membres de sa sous-famille est la taille de son extrémité C-terminale qui comprend environ 80 acides aminés de plus que TREK-1. Son organisation génomique est très proche de celle de TREK-1 et TRAAK (Lesage et al., 2000a).

Dans le SNC, l'expression de TREK-2 est faible dans le cortex mais il est plus présent dans l'hippocampe, le striatum et le bulbe olfactif (Bang et al., 2000; Han et al., 2002; Talley et al., 2001). Son expression n'est pas restreinte aux neurones puisqu'on le retrouve également dans les astrocytes (Gnatenco et al., 2002). Dans le SNP, le canal TREK-2 est fortement exprimé dans les neurones sensoriels des DRG et des ganglions trijumeaux (Kang and Kim, 2006; Kang et al., 2005; Marsh et al., 2012; Medhurst et al., 2001). Il est d'ailleurs, avec le canal TRESK, l'un des canaux K_{2P} les plus exprimés dans les neurones de DRG (Kang and Kim, 2006). Une récente étude a montré que TREK-2 était spécifiquement exprimé dans les neurones de DRG IB4-positifs, qui représentent environ 70% des nocicepteurs de type C (Acosta et al., 2014).

En dehors du système nerveux, TREK-2 est exprimé dans la rate, les testicules, le pancréas et le foie. On le retrouve également exprimé, à un niveau plus faible, dans le placenta, les poumons, le foie, le colon, l'intestin grêle et les oreillettes du cœur (Bang et al., 2000; Gu et al., 2002; Lesage et al., 2000a; Zhang et al., 2008).

Chez l'homme, il existe trois variants d'épissage du premier exon du gène codant pour TREK-2 (Gu et al., 2002; Lesage et al., 2000a). Ces variants, appelés hTREK-2 a, -2b et -2c, diffèrent principalement dans leur région 5' UTR et dans leur région codant pour les 30 premiers acides aminés de la protéine. hTREK-2a est un polypeptide de 538 acides aminés (Lesage et al., 2000a), tandis que hTREK-2b et -2c sont constitués de 508 acides aminés (Gu et al., 2002). Il est intéressant de noter que hTREK-2b possède un site de phosphorylation par la PKC dans son domaine N-terminal qu'on ne retrouve pas chez les deux autres variants (Gu et al., 2002). Même si les différentes isoformes humaines du canal possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles principales, elles ont des patterns d'expression différents. Alors que hTREK-2a est fortement exprimé dans le cerveau, le pancréas et le rein et plus faiblement dans les testicules et le muscle lisse de l'intestin (Lesage et al., 2000a), hTREK-2-b est retrouvé principalement dans le rein et le pancréas et hTREK-2c est majoritairement localisé dans le cerveau (Talley et al., 2001). Récemment, des variants d'épissage de TREK-2 ont été identifiés chez la souris (Mirkovic and Wickman, 2011) : une forme tronquée de TREK-2 qui possède deux domaines TM et un domaine

P (TREK-2-1p) et trois isoformes qui diffèrent par leur extrémité N-terminale TREK-2-a, 2b et 2c. Le pattern d'expression des différents variants murins est sensiblement similaire, mais le variant TREK-2b génère des courants sensiblement plus importants que les autres isoformes et il est plus fortement exprimé à la membrane plasmique (Mirkovic and Wickman, 2011).

Comme pour le canal TREK-1, l'hétérogénéité du canal est augmentée par la présence de sites d'initiation de la traduction alternatifs. Il en existe trois en tout, qui produisent trois isoformes différentes : une longue, une intermédiaire à laquelle il manque les 54 premiers acides aminés, et une courte, avec 66 acides aminés en moins (Simkin et al., 2008). Ces isoformes de l'extrémité N-terminale ont les mêmes propriétés de régulation, seule leur conductance unitaire est modifiée. Le canal intégral présente une conductance autour de 52pS alors que les isoformes plus courtes issues du 2^{ème} ou 3^{ème} site d'initiation ont des conductances plus grandes, entre 185 et 224pS (Simkin et al., 2008).

1. Propriétés électrophysiologiques

Le canal TREK-2, exprimé dans des systèmes d'expression hétérologue, génère des courants instantanés qui ne s'inactivent pas (Lesage et al., 2000a). Comme les courants TREK-1, ils présentent une rectification sortante qui persiste en conditions de potassium symétrique. Lorsque la concentration extracellulaire est riche en K⁺ (150mM), on observe un courant entrant qui n'est pas visible en conditions physiologiques (5mM de K⁺). Le canal est caractérisé par un flickering important, tout comme les autres membres de sa sous-famille (Lesage et al., 2000a).

2. Régulations et partenaires protéiques

Le canal TREK-2 étant très similaire à TREK-1, il partage la grande majorité de ses régulations. Il est insensible au TEA, à la 4-AP et au baryum, et partiellement inhibé par la quinidine (Bang et al., 2000). Il est activé par les anesthésiques volatils tels que l'isoflurane, l'halothane et le chloroforme (Patel et al., 1999) ainsi que par le Riluzole, de façon transitoire (Cadaveira-Mosquera et al., 2011; Duprat et al., 2000), et le zinc (Kim et al., 2005). D'autre part, le canal TREK-2 est inhibé par l'agent antipsychotique chlorpromazine (Thümmeler et al., 2007) et par l'inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, la fluoxétine (Cadaveira-Mosquera et al., 2011).

TREK-2 est sensible à l'étirement membranaire (Lesage et al., 2000a). L'application d'une pression négative en configuration inside-out induit une forte activation du canal qui est réversible et indépendante du cytosol et du cytosquelette. Cette activation peut être provoquée quel que soit le potentiel membranaire, et le niveau d'activation augmente avec la dépolarisation de la membrane (Lesage et al., 2000a) (Figure 24).

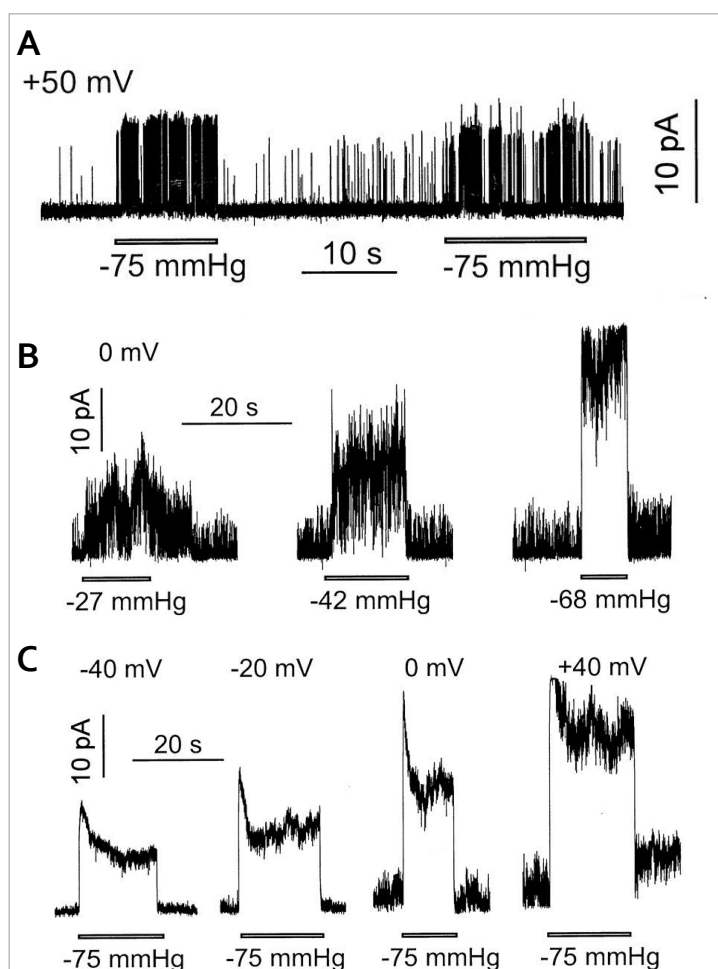


Figure 24 : TREK-2 est un canal mécanosensible. A. Activation réversible du canal TREK-2 par l'étirement membranaire. B. Effet de l'augmentation de l'intensité du stimulus mécanique sur les courants TREK-2. C. Effet du potentiel de membrane sur la mécanosensibilité du canal TREK-2. Enregistrements de patch-clamp de Cellules COS transfectées en configuration inside-out. D'après Lesage et al., 2000a.

Tout comme les autres membres de sa sous-famille, TREK-2 est un canal thermosensible (Kang et al., 2005). Une augmentation progressive de la température ($\sim 0,1^{\circ}\text{C.s}^{-1}$) entraîne une augmentation graduelle des courants TREK-2. Cette augmentation est voltage-indépendante car similaire à des potentiels membranaires différents. Entre 24°C et 37°C , l'activité du canal augmente près de 14 fois tous les 10°C (Kang et al., 2005). Le seuil d'activation de TREK-2 se trouve autour de 25°C , il est donc actif à des températures physiologiques ($\sim 37^{\circ}\text{C}$). L'augmentation de l'activité de TREK-2 induite par la température est entièrement due à l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal et elle est observable à la fois dans les systèmes d'expression hétérologue et dans les neurones sensoriels (Kang et al., 2005) (Figure 25).

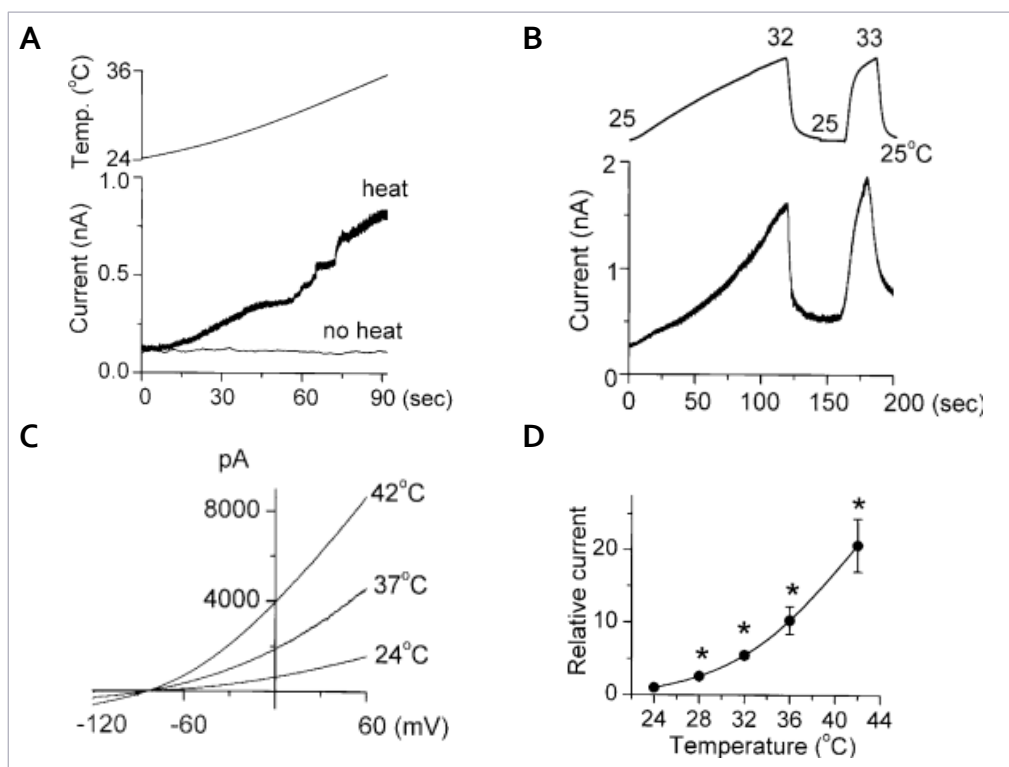


Figure 25 : TREK-2 est un canal thermosensible. A. Activation du canal TREK-2 dans des gammes de température physiologique. B. Activation réversible de TREK-2 par le froid et le chaud. C. Activation graduelle de TREK-2 par la température. Courbes I/V obtenues par application de rampes de voltage à différentes températures. D. Effet de la température sur les courants TREK-2. Ratio normalisé de l'amplitude moyenne des courants. Enregistrements de patch-clamp de cellules COS transfectées en configuration cellule entière. D'après Kang et al., 2005.

Les courants TREK-2 sont fortement augmentés de façon réversible par l'application d'AA (Lesage et al., 2000a). Comme TREK-1, le canal est également activé par d'autres acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et par la LPC mais pas par les acides gras saturés comme l'acide palmitique (Lesage et al., 2000a).

Le canal TREK-2 est également modulé par les variations de pH intra- et extracellulaires (Lesage et al., 2000a; Sandoz et al., 2009). L'acidification du milieu intracellulaire induit une forte augmentation réversible des courants TREK-2, quel que soit le potentiel de membrane (Lesage et al., 2000a), ce qui a également été observé pour le canal TREK-1. Néanmoins, contrairement à TREK-1 qui est inhibé par une acidification du milieu extracellulaire, le canal TREK-2 est lui activé par cette acidification (Sandoz et al., 2009). Le résidu responsable de la sensibilité au proton du canal est une histidine (H151) située dans la boucle extracellulaire TM1P1, équivalente de l'histidine H126 du canal TREK-1. La différence de comportement observée entre TREK-1 et TREK-2 vis-à-vis du pH extracellulaire serait due à des résidus présents sur la boucle P2TM4 qui relie le 2nd domaines pore au 4^{ème} domaine TM (Sandoz et al., 2009).

TREK-2 possède des sites de phosphorylation pour à la fois la PKA et la PKC (Bang et al., 2000) et pourrait donc être potentiellement modulé par ces deux protéines kinases, tout comme TREK-1. La phosphorylation du canal par la PKA induit une diminution significative des courants TREK-2, qui est également observable si on augmente les niveaux d'AMPc cellulaire (Bang et al., 2000). Par contre, la phosphorylation de TREK-2 par la PKC n'a aucun effet sur l'activité du canal (Bang et al., 2000).

Par extension, les canaux TREK-2 sont donc capables d'être modulés par des récepteurs couplés à des protéines G dont l'activation mène à l'activation ou l'inhibition de la PKA. Il n'est pas surprenant alors de voir que TREK-2 est inhibé par des récepteurs couplés à la protéine G_s comme certains récepteurs sérotoninergiques (5HT₄sR) (Lesage et al., 2000a) qui mènent à l'activation de la PKA. Inversement, des récepteurs couplés à la protéine G_i , qui diminuent la phosphorylation par la PKA, activent TREK-2 comme c'est le cas pour les récepteurs mGluR2 (Lesage et al., 2000a). Alors que la phosphorylation par la PKC n'a pas d'effet sur l'activité de TREK-2, il a été rapporté que certains récepteurs couplés à la protéine G_q , comme les récepteurs glutamatergiques mGluR1 ou les récepteurs muscariniques M_3 , qui induisent une activation de la PKC, inhibent TREK-2 (Chemin et al., 2003; Kang et al., 2006; Lesage et al., 2000a). Cela s'expliquerait par le fait que le DAG et la PLC, qui font partie de la voie de signalisation G_q , sont capables d'inhiber TREK-2 (Chemin et al., 2003; Kang et al., 2006). La diminution de l'activité de TREK-2 par la protéine G_q ne passerait donc pas par la phosphorylation du canal par la PKC mais plutôt par l'effet d'autres messagers secondaires comme le DAG et la PLC.

La similarité des extrémités C-terminales des canaux TREK-1 et TREK-2 fait qu'ils partagent également certains partenaires protéiques. En effet, il a été montré que les protéines AKAP150 et Mtap2 étaient capables d'interagir à la fois avec TREK-1 et TREK-2 (Sandoz et al., 2006, 2008).

3. Rôles physiologiques : étude des souris KO

Les régulations de TREK-2 étant pour la grande majorité identiques à celles du canal TREK-1, on peut supposer que les deux canaux remplissent les mêmes rôles. Mais contrairement à TREK-1, la pertinence physiologique de TREK-2 est encore mal connue, en particulier à cause du peu d'études réalisées sur les souris invalidées pour ce canal (TREK-2^{-/-}). Néanmoins, différentes études ont proposé que TREK-2 puisse être impliqué dans la neuroprotection (Kucheryavykh et al., 2009), dans les processus de mémorisation (Deng et al., 2009; Xiao et al., 2009) ou encore la prolifération de cellules cancéreuses (Park et al., 2013).

L'implication de TREK-2 dans des processus de neuroprotection ne serait pas surprenante puisque, comme TREK-1 et TRAAK, il est activé par de nombreux agents neuroprotecteurs, incluant les acides gras polyinsaturés ou le Riluzole. L'induction d'une ischémie cérébrale augmente l'expression de TREK-2 dans les astrocytes, ce qui favorise le maintien de leur potentiel

de membrane et aide à limiter l'excitotoxicité du glutamate en abaissant ses concentrations extracellulaires (Kucheryavykh et al., 2009).

TREK-2 est exprimé dans le cortex entorhinal qui intervient dans la consolidation de la mémoire (Haist et al., 2001; Steffenach et al., 2005). Il a été montré que les canaux TREK-2 diminuent l'excitabilité neuronale dans le cortex entorhinal, intervenant alors dans la diminution de l'apprentissage spatial, et cela via leur activation par les récepteurs GABA_B, couplés à une protéine G_i (Deng et al., 2009). Ce même type de dépression de l'excitabilité neuronale dans le cortex entorhinal peut être induit par les récepteurs adrénergiques α 2A qui, via une protéine G_i, activent TREK-2 (Xiao et al., 2009). Ces deux études laissent supposer que TREK-2 jouerait un rôle dans la consolidation de la mémoire. Néanmoins, il est intéressant de noter que les souris TREK-2^{-/-} ne présentent pas de défaut d'apprentissage (Mirkovic et al., 2012).

Plus récemment, on a identifié le canal TREK-2 dans des cellules de carcinome de la vessie (253J) (Park et al., 2013). TREK-2 est surexprimé dans ces cellules, et il favorise leur prolifération.

Du fait du manque de pharmacologie spécifique pour ces canaux, c'est l'étude des souris TREK-2^{-/-} qui permettra de déterminer précisément quels sont ses rôles physiologiques. Ces souris, générées en 2009 (Guyon et al., 2009) sont en bonne santé et ne présentent pas de différence morphologique notable avec les souris sauvages (Mirkovic et al., 2012). La délétion du canal n'affecte d'ailleurs en rien l'activité motrice de l'animal, ni ses capacités d'apprentissage. L'absence de TREK-2 n'a pas non plus d'effet sur l'anxiété et la dépression de l'animal (Mirkovic et al., 2012).

À mon arrivée au laboratoire, aucune étude ne s'était intéressée au rôle que pourrait jouer le canal TREK-2 dans la perception douloureuse. Pourtant, sa forte expression dans les neurones sensoriels de DRG et ses sensibilités thermique et mécanique laissent supposer qu'il pourrait être un canal important pour la modulation du signal douloureux. Une partie de mon projet de thèse a porté sur l'étude du rôle de TREK-2 dans la douleur. Pour cela, j'ai utilisé des souris invalidées pour TREK-2 et des souris invalidées pour les trois canaux TREK (TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}) afin de déterminer quels étaient les rôles de chacun de ces canaux dans la perception douloureuse.

Les canaux potassiques ont un rôle majeur dans la modulation du message douloureux et plusieurs d'entre eux interviennent dans les effets de différents antalgiques, en particulier dans l'action de la morphine (Ocaña et al., 2004). Dans cette dernière partie, nous allons brièvement présenter les principaux canaux potassiques qui ont été impliqués dans les effets antalgiques de la morphine.

IV L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE : RÔLE DES CANAUX POTASSIQUES

Les opioïdes, comme la morphine, sont les analgésiques les plus couramment utilisés dans le traitement de douleurs sévères. Leurs effets sont produits par trois récepteurs opioïdes (OR) : μ OR, δ OR et κ OR (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002) qui sont des récepteurs couplés aux protéines G_i et G_o . Ces trois récepteurs sont exprimés dans l'ensemble du SN, dans les neurones sensoriels somatiques et viscéraux, dans les neurones de projections et les interneurons de la moelle épinière, dans le mésencéphale et le cortex (Mansour et al., 1995). Les trois types de récepteurs opioïdes ont été identifiés dans les corps cellulaires des neurones sensoriels de DRG (Stein et al., 2001) ainsi que dans les terminaisons des fibres afférentes primaires chez les rongeurs (Coggeshall et al., 1997; Fields et al., 1980; Mousa et al., 2001; Wenk and Honda, 1999) et chez l'homme (Stein et al., 1996). Des études de colocalisation ont montré la présence des récepteurs opioïdes dans les fibres sensorielles de type A et C (Paré et al., 2001). Les OR sont exprimés dans les fibres viscérales exprimant TRPV1 (Poonyachoti et al., 2002) et dans les neurones IB4-, SP- ou CGRP-positives (Borgland et al., 2001; Minami et al., 1995; Wenk and Honda, 1999). Chez la souris, l'expression du récepteur μ OR dans les fibres sensorielles serait plus spécialement restreinte aux fibres non myélinisées exprimant TRPV1, bien qu'il soit également présent dans certaines fibres de type A δ (Scherrer et al., 2009).

Les récepteurs opioïdes inhibent directement la transmission du message douloureux dans les voies ascendantes de la douleur, y compris dans les fibres afférentes primaires (Stein and Machelska, 2011; Wang et al., 1996) et dans la moelle épinière (Glaum et al., 1994; Grudt and Williams, 1994; Wang et al., 1996).

Malgré l'utilisation répandue des opioïdes pour contrôler la douleur, leur efficacité clinique est contrebalancée par des effets secondaires importants : dépression respiratoire, nausées, constipation et surtout une forte dépendance (Benyamin et al., 2008). Il a été montré que le récepteur μ OR est responsable à la fois des effets analgésiques de la morphine et de ses effets secondaires (Matthes et al., 1996), ce qui fait de ce récepteur une cible intéressante pour l'étude des voies de signalisation impliquées dans les effets de la morphine.

L'activation de ces récepteurs peut déclencher différentes voies de signalisation qui diminuent l'excitabilité des terminaisons nociceptives et réduisent la propagation des PAs dans les neurones sensoriels. Cet effet est dû à l'activation de la protéine $G_{o/i}$, couplée au récepteur, qui inhibe l'AC et donc la PKA, réduisant la phosphorylation de canaux calciques voltage-dépendants (Heinke et al., 2011), de canaux sodiques voltage dépendants (Gold and Levine, 1996) et favorisant l'activation de certains canaux potassiques en particulier les canaux K_{ATP} et les canaux

GIRK (Afify et al., 2013; Ikeda et al., 2000; Ocaña et al., 1990; Rodrigues and Duarte, 2000; Torrecilla et al., 2002).

La première étude qui a suggéré un rôle des canaux potassiques dans l'effet antalgique de la morphine médié par les récepteurs μ OR a montré qu'un bloqueur des canaux K_{ATP} , le gibenclamide, est capable d'altérer l'analgésie thermique induite par la morphine lorsqu'elle est injectée en sous-cutané (Ocaña et al., 1990). Par la suite, plusieurs études ont proposé que l'activation des K_{ATP} joue un rôle important dans l'effet antalgique de la morphine tant au niveau spinal (Asano et al., 2000; Kang et al., 1998; Welch and Dunlow, 1993) qu'au niveau des centres supra-spinaux (Lohmann and Welch, 1999; Narita et al., 1992, 1993; Raffa and Martinez, 1995). À ces deux niveaux, le blocage des canaux K_{ATP} réduit l'analgésie induite par la morphine (Kang et al., 1998; Narita et al., 1992; Raffa and Martinez, 1995; Welch and Dunlow, 1993) alors que leur activation la potentialise (Asano et al., 2000; Lohmann and Welch, 1999; Narita et al., 1993). De plus, les canaux K_{ATP} semblent intervenir dans l'effet antalgique de la morphine au niveau des neurones sensoriels périphériques (Rodrigues and Duarte, 2000). Enfin une étude récente montre une implication des canaux K_{ATP} dans l'effet antalgique de la morphine en conditions inflammatoires (Afify et al., 2013).

Les canaux GIRK, canaux potassiques activés par les protéines G, ont été largement impliqués dans l'analgésie induite par les opioïdes (Cruz et al., 2008; Marker et al., 2004, 2005). Chez des animaux portant une mutation du canal GIRK2, l'effet analgésique d'une injection de morphine est largement diminué (Ikeda et al., 2000). D'autre part, la diminution de l'expression des canaux GIRK1 et GIRK2 dans la corne dorsale de la moelle épinière induit une réduction de l'analgésie induite par une injection intrathécale (IT) de morphine (Marker et al., 2004), suggérant un rôle de ces canaux dans l'effet central de la morphine. Une injection en sous-cutané (SC) produit également moins d'analgésie chez ces souris KO pour GIRK1 et GIRK2 par rapport à des souris sauvages (Marker et al., 2002; Mitrovic et al., 2003). Mais il faut noter que le rôle de GIRK2 semble dépendre du type de douleur testé (Mitrovic et al., 2003). Les souris délétées du canal GIRK3 présentent elles aussi une diminution de l'effet analgésique de la morphine mais beaucoup moins forte que celle observée chez les souris $GIRK2^{-/-}$ (Marker et al., 2002, 2004). Plus récemment, une étude a montré que le canal GIRK2 était essentiel dans l'analgésie périphérique induite par la morphine chez l'humain et le rat (Nockemann et al., 2013).

Néanmoins, l'ensemble de ces études ne démontrent qu'un rôle partiel des canaux GIRK dans l'effet analgésique produit par de fortes doses de morphine.

Quelques études ont aussi évalué un rôle possible des canaux K_{Ca} dans l'analgésie induite par la morphine. Mais le blocage des courants SK ou BK, par l'apamine et la charybdotoxine respectivement, administrés en IT ou en intra-plantaire n'affectent pas l'effet antalgique de la morphine (Rodrigues and Duarte, 2000; Welch and Dunlow, 1993). Il semblerait donc que les canaux K_{Ca} ne participent pas à l'effet antalgique de la morphine.

Les canaux TREK sont exprimés à la fois dans les nocicepteurs et les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et, étant modulés par les récepteurs couplés aux protéines Gi, ce sont d'excellents candidats pour intervenir dans l'effet analgésique de la morphine.

Durant ma thèse, j'ai cherché à évaluer quel était le rôle des canaux TREK dans l'effet antalgique de la morphine, à la fois au niveau spinal et au niveau des neurones sensoriels périphériques.

RÉSULTATS

PARTIE 1 : ÉTUDE DU RÔLE DES CANAUX TREK DANS L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer, par une approche électrophysiologique, quel était le rôle des canaux TREK dans l'effet antalgique de la morphine, à la fois au niveau des neurones de la moelle épinière et des neurones sensoriels périphériques.

I RÉSULTATS

A. Couplage fonctionnel entre les canaux TREK et les récepteurs opioïdes

Afin de déterminer s'il existe une relation entre les canaux TREK et la morphine, nous avons étudié par la technique de patch-clamp en configuration potentiel imposé sur cellule entière l'effet de la morphine sur les courants TREK dans des systèmes d'expression hétérologue. Pour cela, nous avons co-exprimé les canaux TREK dans des cellules COS avec les récepteurs opioïdes et mesuré l'activité des canaux TREK par des rampes continues de potentiel imposé de -100mV à +50mV en présence ou non de morphine à 10 μ M. L'ouverture des canaux va entraîner un redressement de la courbe courant/voltage. Nous avons contrôlé la présence des canaux TREK dans les cellules par l'application d'acide arachidonique (AA) 10 μ M, un fort activateur de ces canaux.

1. Le canal TREK-1 et les récepteurs opioïdes

Nous avons d'abord observé l'effet de l'application de morphine sur les courants TREK-1 en co-transfectant les cellules COS-7 avec le canal TREK-1 et le récepteur μ OR.

L'application de morphine augmente significativement les courants TREK-1 (**Figure 26 A, B et C**). Cet effet est bien spécifique du canal TREK-1 puisqu'il est absent dans des cellules non transfectées. De plus, l'activation de TREK-1 par la morphine n'est pas une activation directe du canal car elle nécessite la présence des récepteurs μ OR dans les cellules.

Le récepteur μ OR est le principal responsable de l'analgésie induite par la morphine (**Matthes et al., 1996**) mais le récepteur δ OR est lui aussi capable d'induire cette analgésie (**Gaveriaux-Ruff et al., 2011; Marker et al., 2005; Pacheco et al., 2012a, 2012b**). De plus, ces deux récepteurs sont couplés aux mêmes voies de signalisation intracellulaire, via Gi/Go. Nous avons donc voulu déterminer si le couplage fonctionnel que nous avons observé entre TREK-1 et le récepteur μ OR qui conduit à l'activation de TREK-1 en réponse à la stimulation du récepteur par la morphine,

existait également entre le canal TREK-1 et le récepteur δ OR. Lorsque le canal TREK-1 et le récepteur δ OR sont coexprimés dans des cellules COS, l'application de morphine active les courants TREK-1 (Figure 26 D).

Dans un système d'expression hétérologue, il existe donc un couplage fonctionnel entre le canal TREK-1 et les récepteurs opioïdes μ OR et δ OR.

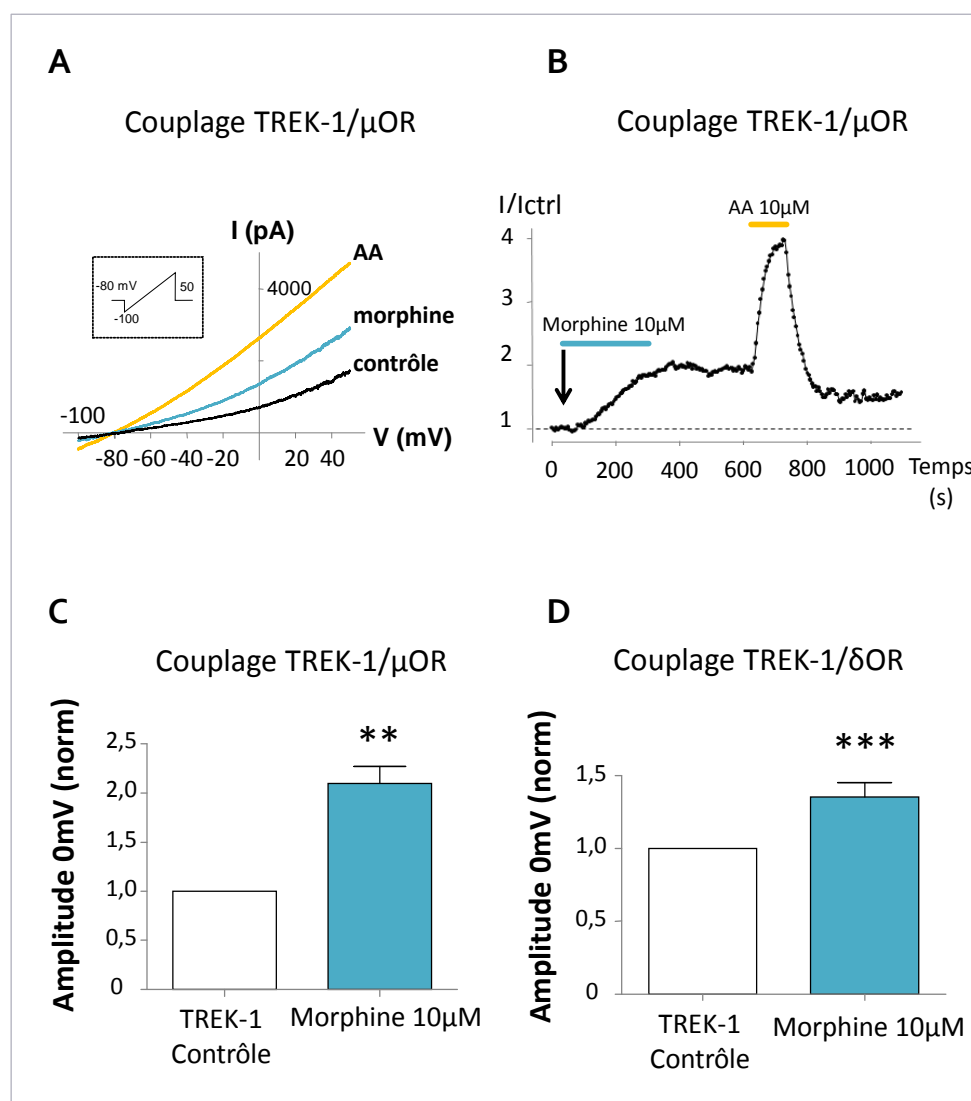


Figure 26 : Couplage fonctionnel entre le canal TREK-1 et les récepteurs opioïdes μ OR et δ OR. **A.** Courbes intensité/voltage (I/V) du courant TREK-1. Observé dans des cellules COS, co-transfectées avec TREK-1 et μ OR, lors de rampes de voltage (-100mV à +50mV, 800ms) en présence ou non de morphine 10 μ M (bleu) ou d'acide arachidonique 10 μ M (AA, orange). **B.** Courant TREK-1 mesuré à 0mV. Trace caractéristique du courant TREK-1 à 0mV, courant normalisé par la valeur moyenne avant application de morphine (I/I_{ctrl}) qui illustre l'activation du canal par la morphine et l'AA. **C.** Couplage fonctionnel entre TREK-1 et μ OR. Intensité du courant TREK-1 à 0mV normalisé (I/I_{ctrl}) en présence ou non de morphine 10 μ M (n=10 cellules). **D.** Couplage fonctionnel entre TREK-1 et δ OR. Intensité du courant TREK-1 à 0mV normalisé (I/I_{ctrl}) en présence ou non de morphine 10 μ M (n=18 cellules). La différence significative entre les courants contrôle et morphine est indiquée par : ** (p<0,01) et *** (p<0,001). Test Wilcoxon sur échantillons appariés.

2. Les canaux TREK-2 et TRAAK et les récepteurs μ OR

Les canaux TREK partagent de nombreuses régulations similaires. Nous avons donc étudié si les deux autres membres de la sous-famille peuvent eux-aussi être activés par la morphine en co-exprimant TREK-2 ou TRAAK avec les récepteurs μ OR dans des cellules COS. Comme observé pour TREK-1, l'application de morphine induit l'activation du canal TREK-2 (Figure 27 A-B) alors qu'elle n'a aucun effet sur l'activité du canal TRAAK (Figure 27 C-D).

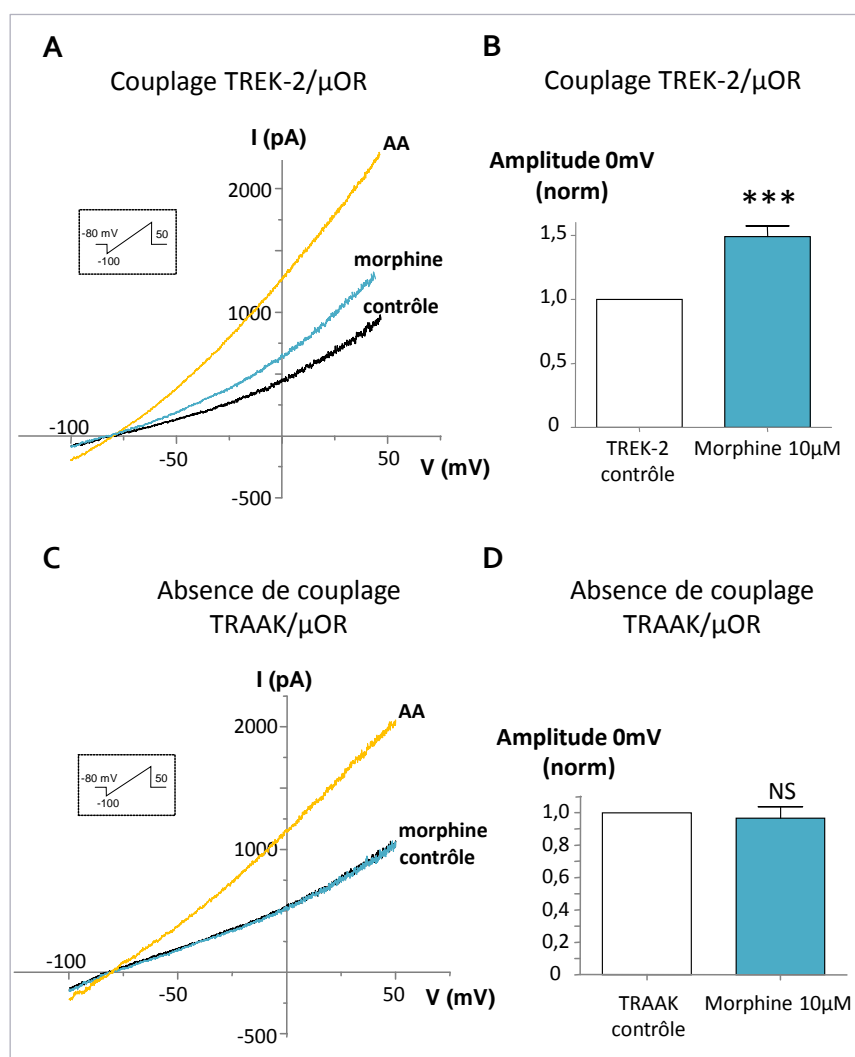


Figure 27 : Couplage fonctionnel entre le canal TREK-2 et le récepteur μ OR. A. Courbes intensité/voltage (I/V) du courant TREK-2. Observé dans des cellules COS, co-transfectées avec TREK-2 et μ OR, lors de rampes de voltage (-100mV à +50mV, 800ms) en présence ou non de morphine 10 μ M (bleu) ou d'acide arachidonique 10 μ M (AA, orange). n=17 cellules. B. **Couplage fonctionnel entre TREK-2 et μ OR.** Intensité du courant TREK-2 à 0mV normalisée (I/I_{ctrl}) en présence ou non de morphine 10 μ M (n=17 cellules). C. Courbes intensité/voltage (I/V) du courant TRAAK. Observé dans des cellules COS, co-transfectées avec TRAAK et μ OR, lors de rampes de voltage (-100mV à +50mV, 800ms) en présence ou non de morphine 10 μ M (bleu) ou d'acide arachidonique 10 μ M (AA, orange). D. **Absence de couplage fonctionnel entre le canal TRAAK et μ OR.** Intensité du courant TRAAK à 0mV normalisée (I/I_{ctrl}) en présence ou non de morphine 10 μ M (n=5 cellules). NS : non significatif. La différence significative entre les courants contrôle et morphine est indiquée par : *** (p<0,001). Test Wilcoxon sur échantillons appariés.

Nous avons donc pu établir que, dans ces conditions, les canaux TREK-1 et TREK-2 peuvent être activés par la morphine via un couplage fonctionnel avec les récepteurs μ OR. Par contre, ce couplage n'a pas lieu avec le canal TRAAK. TREK-1 et TREK-2 sont tous les deux modulés par les récepteurs couplés aux protéines G (Mathie, 2007). Nous savons que les canaux TREK-1 et TREK-2 sont régulés par la phosphorylation par la PKA et que les récepteurs couplés à la protéine G_i lèvent cette inhibition tonique par la diminution de l'activité de la PKA. Le canal TRAAK n'est pas modulé par cette phosphorylation (Mathie, 2007). L'augmentation de l'activité des canaux TREK-1 et TREK-2 par la stimulation des récepteurs μ et δ OR par la morphine pourrait résulter d'une diminution de l'activité de la PKA via la protéine G_i couplée à ces récepteurs. Cette hypothèse a été testée par des expériences réalisées au laboratoire par le Dr. Deval. L'effet de la stimulation des OR avec la morphine a été étudié sur une forme du canal TREK-1 muté sur l'un des principaux sites de phosphorylation du canal par la PKA, la sérine 333, remplacée par l'acide aspartique. Le canal mutant TREK-1-S333D mime une phosphorylation constitutive par la PKA, ce qui inactive le canal (Murbartián et al., 2005; Noël et al., 2011; Patel et al., 1998). La morphine perd tout effet sur le canal TREK-1-S333D (Devilliers et al., 2013), montrant ainsi que la sérine 333, l'acide aminé principalement impliqué dans la phosphorylation PKA-dépendante du canal TREK-1 semble être essentielle à l'activation du canal par la morphine et les récepteurs aux opioïdes.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle du canal TREK-1 dans l'activité antalgique de la morphine. Nous avons étudié, par une approche d'imagerie calcique sur des neurones en culture, le rôle du canal TREK-1 dans la modulation de l'activité des neurones de la corne dorsale de moelle épinière et des neurones périphériques de DRG par la morphine.

B. Implication de TREK-1 dans l'activité de la morphine sur les neurones de corne dorsale de moelle épinière

La morphine, via ses récepteurs μ OR et δ OR, diminue l'excitabilité des neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière (Glaum et al., 1994; Grudt and Williams, 1994). Les canaux TREK-1 et les récepteurs μ OR étant tous deux exprimés dans la corne dorsale de la moelle épinière (Mansour et al., 1995; Talley et al., 2001), nous avons voulu déterminer si TREK-1 peut être un des effecteurs de l'activité de la morphine dans des neurones de moelle épinière. Nous avons observé par imagerie calcique la réponse de neurones de moelle de souris sauvages ou TREK-1^{-/-} à l'application de glutamate 10 μ M en présence ou en absence de morphine 10 μ M. Nous avons choisi de stimuler les neurones avec le glutamate parce que c'est le principal neuromédiateur excitateur de la moelle épinière et le neuromédiateur impliqué dans la

transmission du message nociceptif provenant des afférences primaires sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Le glutamate en application de courte durée, moins d'une minute, agit essentiellement sur les récepteurs ionotropiques iGluR excitateurs dépolarisants qui stimulent les neurones et activent l'influx de calcium extracellulaire. Les récepteurs GluN (récepteurs NMDA) et certains sous-types de récepteurs GluA, qui ne contiennent pas la sous-unité GluA2 et sont essentiellement présents dans les interneurones, sont perméables au calcium et participent directement à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire en réponse au glutamate (Gielen, 2010). Notre hypothèse est que la morphine, agissant sur les récepteurs μ ou δ OR, pourrait stimuler l'activité du canal TREK-1 hyperpolarisant inhibiteur pour s'opposer et réduire la dépolarisation des neurones et l'influx de calcium extracellulaire en réponse au glutamate.

Nous avons mesuré les variations de la concentration de calcium intracellulaire dans des cultures primaires de neurones de moelle épinière grâce à une sonde calcique fluorescente, le FURA-2. L'intensité basale de fluorescence des neurones chargés de Fura-2, qui est une indication de la concentration de calcium intracellulaire au repos dans les neurones, est enregistrée pendant 1min, puis une solution de glutamate à 10 μ M est appliquée sur les neurones pendant 1min ce qui induit une augmentation de la concentration de calcium dans les cellules. Une solution de glutamate 10 μ M et morphine 10 μ M est ensuite perfusée sur les cellules. Ces mesures sont réalisées en parallèle sur des cultures de neurones de souris sauvage et de souris TREK-1^{-/-}. Près de 100% des neurones de moelle épinière en culture, indépendamment du génotype, répondent à l'application de glutamate (10 μ M) par une augmentation significative de la concentration intracellulaire de calcium (augmentation du ratio de fluorescence du Fura-2, (Figure 28), ceci, bien que la constitution de la moelle épinière est très complexe et que plusieurs populations de neurones sont présentes dans les cultures primaires de neurones de moelle. Nous avons mesuré, pour chaque génotype, l'inhibition du signal calcique induit par la morphine sur la réponse au glutamate (% d'inhibition) et la fraction de neurones dont la réponse calcique est diminuée d'au moins 20% par la co-application de morphine et de glutamate par rapport à la réponse calcium au glutamate.

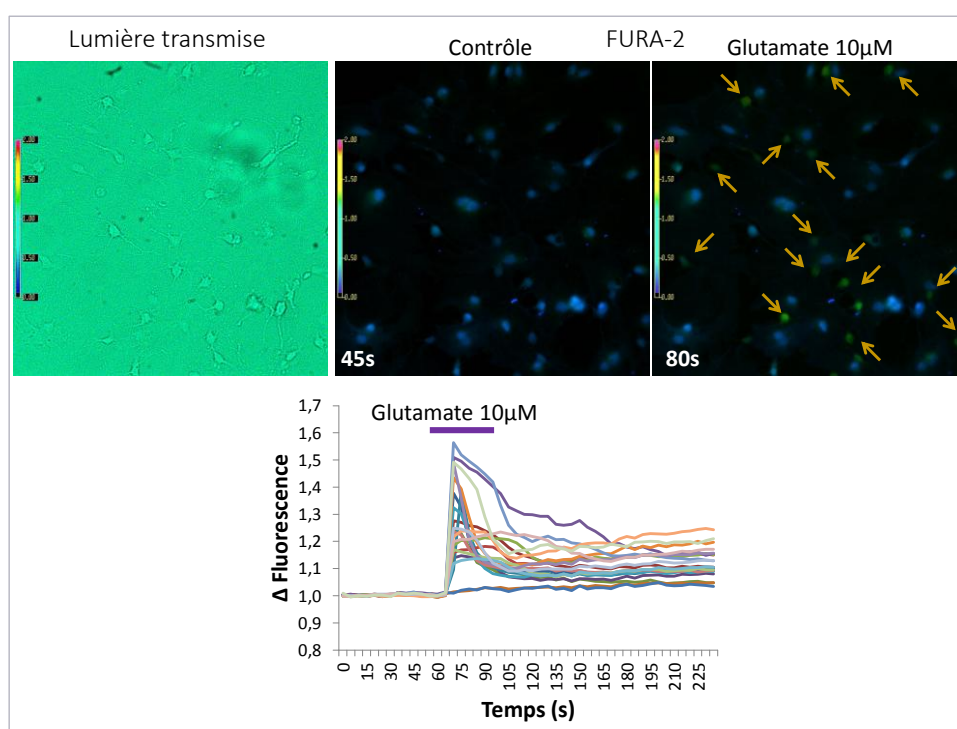


Figure 28 : Étude de la réponse calcique au glutamate des neurones de moelle épinière par imagerie calcique. Les régions d'intérêt (RI) sont définies manuellement sur l'image en lumière transmise (en haut à gauche) autour des corps cellulaires des neurones. Les deux images en haut à droite représentent le ratio de fluorescence F_{340}/F_{380} du FURA-2 avant et après application de glutamate $10\mu\text{M}$, illustrant les réponses des neurones au glutamate (flèches). En bas, sont représentées les variations du ratio de fluorescence (Δflu), normalisées par la fluorescence basale de chaque cellule, en fonction du temps. Chaque courbe correspondant aux variations de fluorescence d'une cellule.

24% des neurones de génotype sauvage présentent une diminution de fluorescence significative après application de la morphine. Seuls 9% des neurones TREK-1^{-/-} montrent une diminution de la réponse calcique lors de la co-application de morphine ($10\mu\text{M}$) avec du glutamate ($10\mu\text{M}$) (**Figure 29 A**). D'autre part, l'effet de la morphine est mesuré en pourcentage d'inhibition qui correspond à la variation de fluorescence observée avant et après application de morphine (soit $F_{\text{Glutamate+Morphine}} - F_{\text{Glutamate}}$) rapportée à la valeur moyenne de l'intensité de la fluorescence basale de la cellule. La morphine induit une inhibition de 62% de la réponse calcique au glutamate (mesurée par la variation de fluorescence du Fura-2 dans les cellules) des neurones sauvages et de 51% dans les neurones TREK-1^{-/-} (**Figure 29 B**).

Ces résultats montrent que l'absence du canal TREK-1 diminue en partie l'effet inhibiteur de la morphine sur certaines populations de neurones de moelle épinière. TREK-1 pourrait donc être l'un des effecteurs, au même titre que les canaux GIRK, impliqués dans l'effet de la morphine au niveau de la moelle épinière.

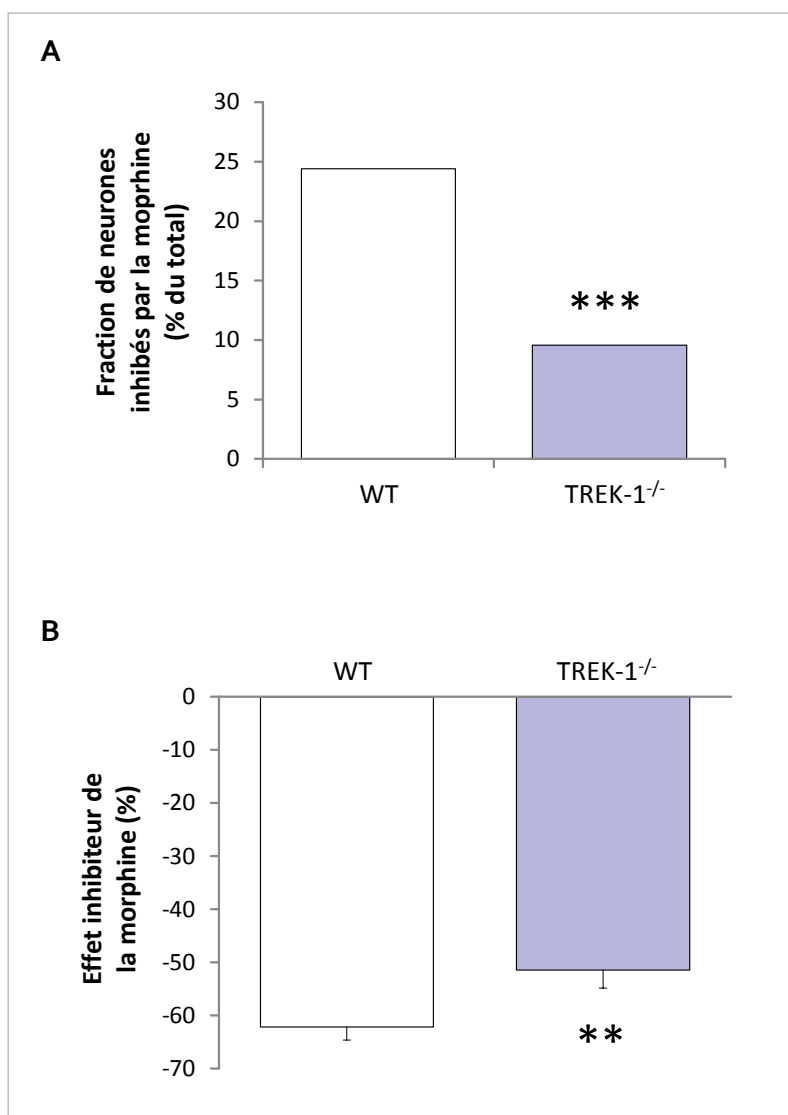


Figure 29 : Effet de la morphine sur la réponse calcique au glutamate des neurones de moelle épinière de souris. A. Fraction de neurones sensibles à la morphine. Pourcentage de neurones sauvages (WT, blanc, n=434 cellules testées sur 22 expériences, 4 souris) ou TREK-1^{-/-} (violet, n=470 cellules testées sur 23 expériences, 4 souris) inhibés par l'application de morphine 10μM. **B. Effet de la morphine sur l'excitabilité des neurones de moelle.** L'effet inhibiteur de la morphine correspond à la variation de fluorescence qu'elle induit, rapportée à la valeur moyenne de la fluorescence avant application de morphine. WT : n=106 cellules; TREK-1^{-/-} : n=45 cellules. La différence significative entre les neurones WT et TREK-1^{-/-} est indiquée par : ** (p<0,01) et *** (p<0,001). Test Chi2 (fractions) et Mann Whitney (effet inhibiteur).

C. Implication de TREK-1 dans l'effet de la morphine sur les neurones de DRG

J'ai ensuite étudié le rôle du canal TREK-1 dans l'effet inhibiteur de la morphine dans les neurones de DRG. Pour cela nous avons étudié en imagerie calcique la thermosensibilité des neurones de DRG de souris sauvages et TREK-1^{-/-} en culture primaire en conditions basales ou en présence de morphine à 10 μ M. Les variations de la concentration de calcium intracellulaire des neurones de petit diamètre (<20 μ m), qui correspondent aux neurones nociceptifs, ont été étudiées en réponse à une augmentation de la température du milieu de perfusion baignant les neurones de 30°C à 48°C. Les mesures sont faites en conditions basales pendant 1min à 30°C, température de la peau, puis le milieu extracellulaire perfusé sur les cellules est chauffé jusqu'à 48°C en moins d'une minute avant de redescendre à 30°C (Figure 30).

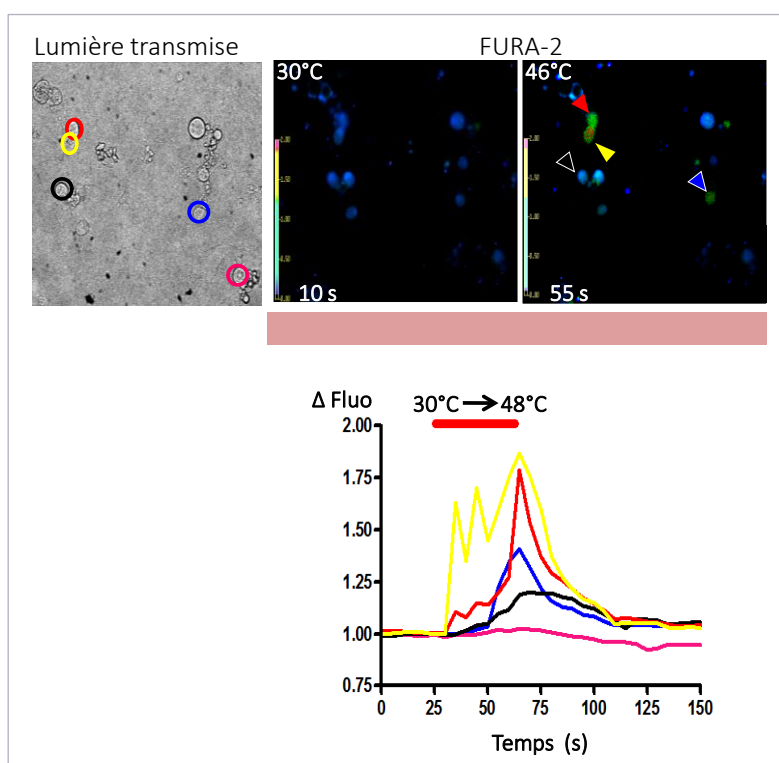


Figure 30 : Étude de la sensibilité thermique de neurones sensoriels de DRG par imagerie calcique. Les régions d'intérêt (RI) sont définies manuellement sur l'image en lumière transmise (en haut à gauche) autour des corps cellulaires des neurones sensoriels identifiés par leur forme ronde. Les deux images en haut à droite représentent le ratio de fluorescence F_{340}/F_{380} du FURA-2 à différentes températures, illustrant les réponses des neurones au chaud (images en pseudocouleur). En bas, sont représentées les variations du ratio de fluorescence normalisées (Δ fluo) en fonction du temps, chaque courbe correspondant aux variations de fluorescence de la RI de couleur correspondante. Dans cet exemple, quatre cellules sont activées par le chaud (jaune, bleu, rouge et noir).

Les cellules traitées par la morphine sont perfusées pendant 10min avant le début de la rampe chaude qui se fait en présence continue de morphine 10 μ M. Nous avons mesuré à la fois la fraction de neurones thermosensibles, dans les neurones de chaque génotype et l'amplitude des réponses à l'augmentation de la température, soit la variation de fluorescence pendant la rampe, en conditions basales ou après traitement à la morphine.

La fraction de neurones thermosensibles est plus importante chez les neurones TREK-1^{-/-} que chez les neurones sauvages, ce qui est cohérent avec les données déjà publiées (Noël et al., 2009). Le traitement par la morphine n'a pas d'effet significatif sur les fractions de neurones de DRG thermosensibles sauvages ou TREK-1^{-/-} (Figure 31 A). Toutefois, la morphine réduit significativement l'amplitude des variations de calcium intracellulaire en réponse à la température des neurones sauvages. La réponse calcique des neurones TREK-1^{-/-} n'est quant à elle pas significativement affectée par ce traitement (Figure 31 B). Le canal TREK-1 pourrait donc être impliqué dans les effets de la morphine en diminuant la réponse des neurones de DRG thermosensibles à la température.

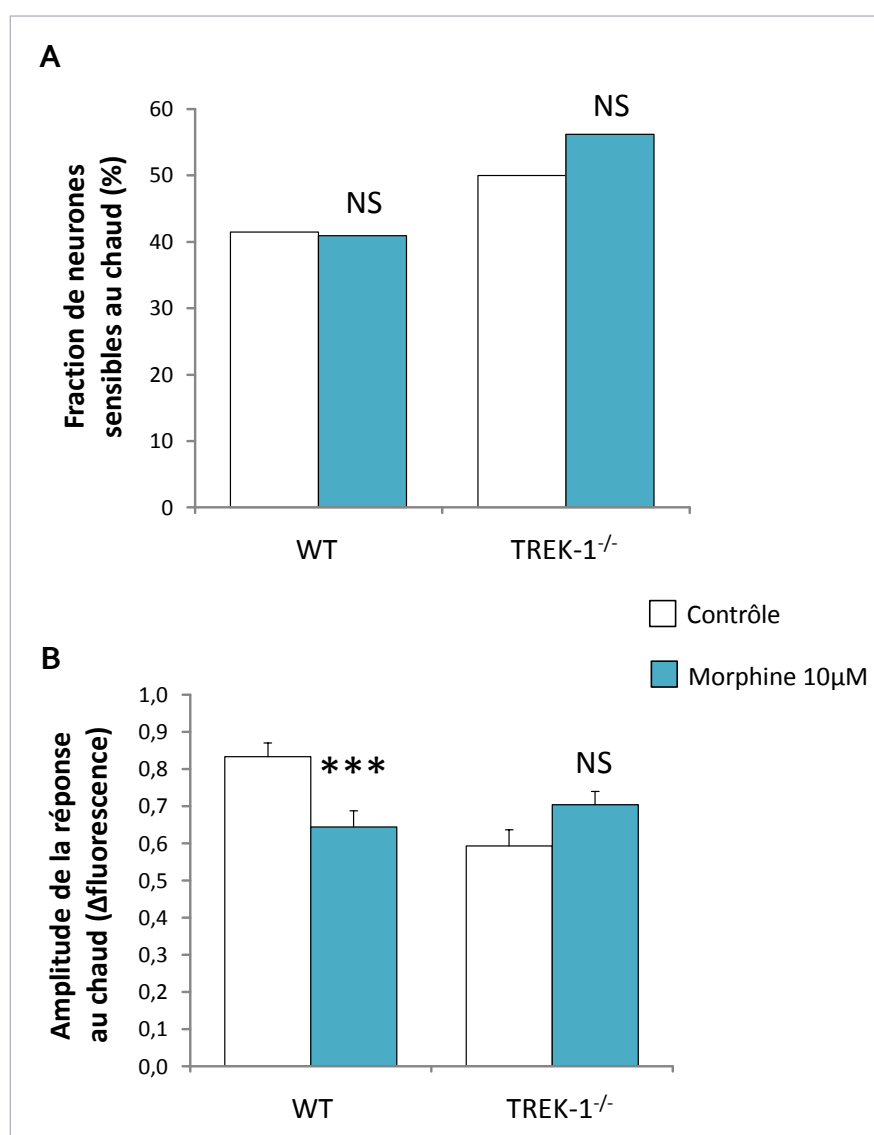


Figure 31 : Effet de la morphine sur la thermo sensibilité des neurones sensoriels de DRG. A. Effet de la morphine sur la fraction de neurones activés par le chaud. Les fractions de neurones sensibles au chaud de souris sauvages (WT, n=188 cellules testées en 5 expériences, 4 animaux) et TREK-1^{-/-} (n=112 cellules testées en 4 expériences, 4 souris) en condition contrôle sont représentées en blanc. Les fractions de neurones sensibles au chaud de souris WT (n=176 cellules testées en 5 expériences, 4 animaux) et TREK-1^{-/-} (n=203 cellules testées en 6 expériences, 4 souris) traitées avec de la morphine 10μM sont représentées en bleu. **B. Effet de la morphine sur l'intensité de la réponse au chaud des neurones sensoriels de DRG.** L'amplitude de la réponse au chaud des neurones correspond à la variation de fluorescence induite par le stimulus. WT : n=78 cellules contrôle, 72 cellules morphine; TREK-1^{-/-} : n=56 cellules contrôle, 114 cellules morphine. La différence significative entre contrôle et morphine est indiquée par : *** (p<0,001). Test Chi2 (fractions) et Mann Whitney (amplitudes des réponses).

II DISCUSSION

Par des approches électrophysiologiques nous avons pu mettre en évidence un couplage fonctionnel entre les canaux TREK-1 et TREK-2 et les récepteurs opioïdes μ dans des lignées cellulaires COS-7. Par une technique d'imagerie de fluorescence du calcium intracellulaire, nous avons également montré que le canal TREK-1 est impliqué dans les effets inhibiteurs de la morphine sur les réponses des neurones.

Ces résultats ont été corrélés par une étude comportementale réalisée sur les souris TREK-1^{-/-} et TREK-2^{-/-} en parallèle par une collaboration avec l'équipe du Pr. Alain Eschaliér du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur (INSERM U766) de Clermont-Ferrand. Différents tests de douleur provoquée par des stimuli thermique ont été réalisés sur les souris sauvages et TREK-1^{-/-} afin d'évaluer l'impact de la délétion du canal TREK-1 sur l'activité analgésique de la morphine chez les souris. La thermosensibilité des animaux a été mesurée par les tests de l'immersion de la queue et de la plaque chaude. Le premier test consiste à immerger la queue de l'animal dans un bain à température contrôlée (ici 46°C) et de mesure la latence de retrait de la queue qui correspond au seuil de douleur. Pour le second test, la souris est placée sur une plaque chauffée (52°C) et le seuil de douleur correspond au temps à partir duquel l'animal commence à présenter des signes douloureux (agitation, sauts ou léchage des pattes). L'effet analgésique de la morphine a été déterminé en calculant la variation des latences pré- et post-injection de morphine pour chaque animal.

Dans les deux tests, l'injection systémique de morphine à 3 et 5mg.kg⁻¹ induit une forte analgésie chez les animaux sauvages qui est significativement diminuée chez les animaux TREK-1^{-/-} (Figure 32) (Devilliers et al., 2013). Ces mêmes expériences ont été réalisées en conditions pathologiques, dans des modèles de douleur post-opératoire (modèle de Brennan) et de douleur neuropathique (ligature du nerf sciatique). Pour ces deux modèles, l'analgésie induite par la morphine est fortement réduite chez les souris TREK-1^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Devilliers et al., 2013) (Figure 33). Ces résultats nous montrent que le canal TREK-1 est impliqué dans l'analgésie thermique provoquée par la morphine en conditions physiologiques et pathologiques. L'injection de fentanyl, un agoniste sélectif des récepteurs μ OR, provoque également une analgésie qui est réduite chez les souris TREK-1^{-/-} (Devilliers et al., 2013), ce qui nous indique que cet effet est principalement dû à l'activation du récepteur μ OR.

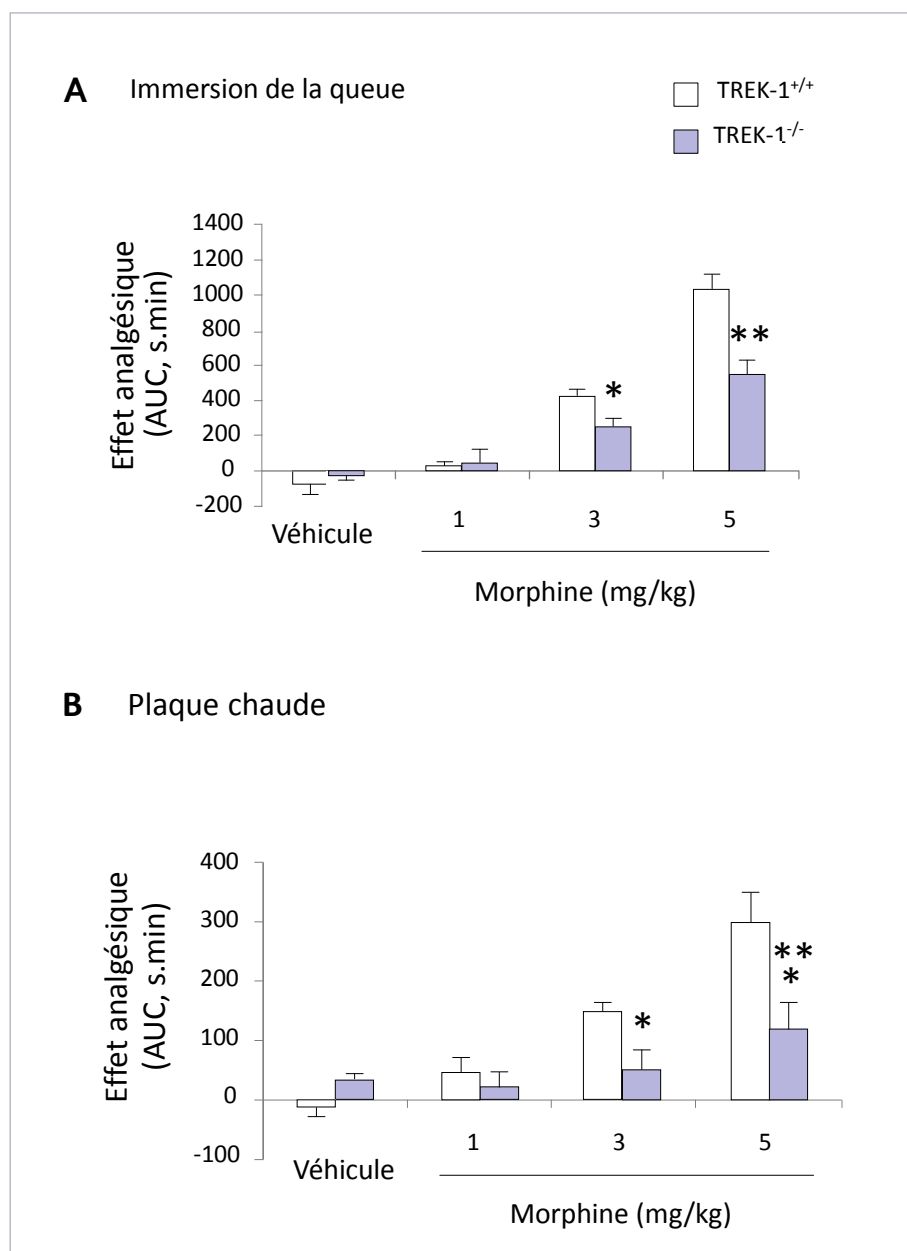


Figure 32 : Rôle du canal TREK-1 dans l'analgésie thermique induite par la morphine en conditions physiologiques. **A. Test d'immersion de la queue.** La queue de souris WT (blanc) et TREK-1^{-/-} (violet) est trempée dans de l'eau à 46°C avant et après injection sous-cutanée de morphine 3mg.k⁻¹. On mesure le temps avant retrait de la queue, signe de douleur. L'effet analgésique correspond à la différence de latence de retrait observée après injection de morphine (représenté en aire sous la courbe, AUC). **B. Test de la plaque chaude.** Des souris WT et TREK-1^{-/-} sont placées sur une plaque chauffée à 52°C. On mesure le temps avant apparition des premiers signes de douleur (saut, léchage ou secousse de la patte). D'après Devilliers et al., 2013.

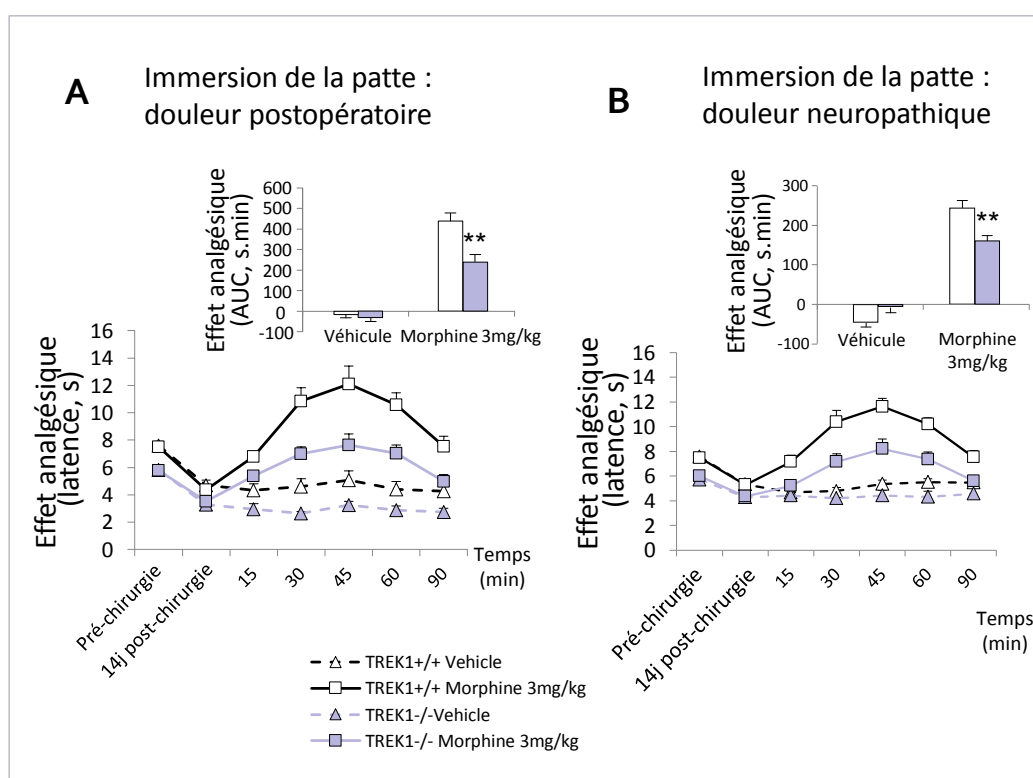


Figure 33 : Rôle du canal TREK-1 dans l'analgésie thermique induite par la morphine en conditions pathologiques. A. Test d'immersion de la patte dans un modèle de douleur postopératoire. La patte arrière de souris WT (blanc) et TREK-1^{-/-} (violet), incisée 48h auparavant, est trempée dans de l'eau à 46°C avant et après injection sous-cutanée de morphine 3mg.k⁻¹. On mesure le temps avant retrait de la queue, signe de douleur. L'effet analgésique correspond à la différence de latence de retrait observée après injection de morphine. L'insert représente l'aire sous la courbe (AUC). B. Test d'immersion de la patte dans un modèle de douleur neuropathique. La patte arrière de souris WT et TREK-1^{-/-}, dont on a ligaturé le nerf sciatique 14j auparavant, est trempée dans de l'eau à 46°C avant et après injection sous-cutanée de morphine 3mg.k⁻¹. On mesure le temps avant retrait de la queue, signe de douleur. L'effet analgésique correspond à la différence de latence de retrait observée après injection de morphine. L'insert représente l'aire sous la courbe (AUC). D'après Devilliers et al., 2013.

L'étude du couplage fonctionnel entre TREK-1 et le récepteur μ OR semble indiquer que l'activation de TREK-1 passe par l'action de la protéine G_i couplée au récepteur opioïde. Cette protéine, via l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase, réduit la phosphorylation du canal TREK-1 par la PKA levant ainsi son inhibition. L'ouverture du canal hyperpolarise le neurone et diminue son excitabilité, à l'origine de l'analgésie. Nous avons pu montrer dans un système d'expression hétérologue que l'activation de TREK-1 par la morphine nécessite la sérine 333, principale sérine phosphorylée par la PKA. Cela suggère que le couplage fonctionnel entre TREK-1 et le récepteur μ OR passe par la voie de l'inhibition de l'adénylate cyclase par la protéine G_i , et la diminution de l'activité PKA. Il faudrait confirmer cette hypothèse dans un contexte neuronal, mais il est difficile d'enregistrer *in situ* les courants de fond. De plus, même si nous savons que le canal TREK-1 et le récepteur μ OR sont tous les deux exprimés dans les neurones de DRG et les neurones de la corne dorsale, il nous faudra démontrer une colocalisation de ces deux protéines dans les mêmes

neurones. Pour l'instant, les expériences que nous avons réalisées avec des anticorps dirigées contre ces deux protéines ne sont pas concluantes car les différents anticorps anti-TREK-1 disponibles se sont avérés peu spécifiques. Une approche par hybridation in situ d'ARNm est en cours de développement par nos collaborateurs du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur de Clermont-Ferrand.

Nous avons également montré que TREK-1 peut également être activé par les récepteurs δ OR. Ces récepteurs, bien que cela ait été controversé, sont eux aussi impliqués dans l'analgésie induite par la morphine (Gaveriaux-Ruff et al., 2011; Pacheco et al., 2012a, 2012b). Les études comportementales réalisées par l'équipe du Pr. Eschalier laissent supposer que TREK-1 serait impliqué dans l'effet analgésique de la morphine via leur activation par les récepteurs μ OR. Néanmoins, dans ces expériences, seule l'analgésie thermique a été observée. Une étude a récemment proposé que les nocicepteurs qui expriment le récepteur δ OR ont une sensibilité mécanique alors que ceux exprimant les récepteurs μ OR seraient thermosensibles (Scherrer et al., 2009). Nous aimerions valider cette hypothèse en utilisant la technique de nerf-peau qui nous permet d'enregistrer l'activité de fibres nerveuses unitaires *ex vivo*. Nous pourrions alors vérifier, en utilisant des agonistes spécifiques des différents récepteurs opioïdes, le DAMGO pour les récepteurs μ OR (Hirning et al., 1985) et le SNC80 pour les récepteurs δ OR (Bilsky et al., 1995) si les fibres sensorielles exprimant ces récepteurs ont une sensibilité spécifique au type de récepteur qu'elles expriment. Nous nous intéresserons alors à l'implication du canal TREK-1 dans l'analgésie induite par les récepteurs δ OR.

Nos résultats ont mis en évidence l'implication du canal TREK-1 dans l'analgésie par la morphine au niveau des neurones de moelle épinière. Chez les souris TREK-1^{-/-}, on observe une diminution de l'effet de la morphine sur l'excitabilité de ces neurones. Mais l'effet ne disparaissant pas totalement, cela suggère que TREK-1 n'est pas le seul effecteur de la morphine au niveau central. Ceci est cohérent avec les données précédemment publiées qui ont montré que, dans la moelle épinière, la morphine peut activer d'autres canaux potassiques : les canaux K_{ATP} et les canaux GIRK (Asano et al., 2000; Marker et al., 2004, 2005). Les canaux GIRK ont été particulièrement impliqués dans l'effet central de la morphine (Marker et al., 2005). Nos collaborateurs ont observé que l'injection intrathécale de tertiapine, un inhibiteur des canaux GIRK, ne réduit que partiellement l'effet analgésique de la morphine administrée à une dose de 5mg.kg⁻¹ mais n'affecte pas l'analgésie induite par une dose plus faible (3mg.kg⁻¹) (Devilliers et al., 2013). Les canaux GIRK seraient donc principalement impliqués dans l'analgésie par la morphine à fortes doses, ce qui est en adéquation avec la littérature (Cruz et al., 2008), alors que le canal TREK-1 intervient à des doses plus faibles.

Contrairement à ce que nous avons observé dans les neurones de moelle, la délétion du canal TREK-1 supprime l'effet analgésique de la morphine sur les neurones sensoriels de DRG. Cela suggère que TREK-1 est nécessaire et suffisant à l'analgésie thermique induite par la

morphine en périphérie. Il avait été montré récemment que les canaux GIRK2 étaient eux aussi impliqués dans ce mécanisme (Nockemann et al., 2013). Néanmoins, alors qu'ils sont présents chez l'homme et le rat, les canaux GIRK2 ne semblent pas être exprimés dans ces neurones chez la souris (Nockemann et al., 2013) et n'interviendraient donc pas dans l'effet de la morphine dans cette espèce. Une autre étude a montré que les canaux K_{ATP} pourraient eux aussi intervenir dans l'effet périphérique de la morphine (Rodrigues and Duarte, 2000), mais cette étude n'a évalué que l'analgésie mécanique de la morphine dans des conditions d'inflammation. Il est donc possible que le canal TREK-1 ne soit responsable que de l'analgésie thermique ou qu'il n'intervienne pas dans des conditions d'inflammation, et que d'autres canaux soient impliqués, comme les canaux K_{ATP} .

L'ensemble de cette étude a révélé le canal TREK-1 comme un effecteur majeur des récepteurs μ OR dans l'analgésie par la morphine. Les récepteurs μ OR sont responsables à la fois des effets analgésiques et des effets secondaires délétères de la morphine (Matthes et al., 1996). Pourtant, l'étude comportementale des souris TREK-1^{-/-} réalisée par nos collaborateurs a montré que les principaux effets secondaires de la morphine (dépendance, dépression respiratoire et constipation) sont toujours présents chez les souris KO (Devilliers et al., 2013). Le canal TREK-1 joue donc un rôle majeur dans l'effet antalgique de la morphine mais n'intervient pas dans ses effets secondaires délétères. TREK-1 est donc une cible de choix dans le développement de nouveaux antalgiques puissants et dénués d'effets secondaires.

Le canal TREK-2 est également activé par la morphine et, du fait des nombreuses propriétés structurelles et fonctionnelles qu'il partage avec TREK-1, pourrait lui aussi être un effecteur de l'effet analgésique de la morphine. Avant de tenter de répondre à cette question, nous avons voulu déterminer quel était le rôle du canal TREK-2 dans la douleur. Alors que nous savons que TREK-1 et TRAAK sont impliqués dans la perception polymodale de la douleur, le rôle de TREK-2 dans la nociception était jusqu'à présent inconnu. La seconde partie de mon projet de thèse a porté sur l'étude de l'impact de la délétion du canal TREK-2 sur la perception douloureuse.

PARTIE 2 : ÉTUDE DU RÔLE DU CANAL TREK-2 DANS LA DOULEUR

Dans cette seconde partie de mon projet de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au canal TREK-2. J'ai cherché à déterminer si, comme les autres membres de sa sous-famille, TREK-2 pouvait être impliqué dans la perception douloureuse. J'ai étudié l'impact de la délétion du canal sur la thermosensibilité de neurones sensoriels de DRG et de fibres nociceptives de type C de souris invalidées pour le canal TREK-2 (TREK-2^{-/-}). En parallèle, des études comportementales ont été réalisées sur ces mêmes souris par nos collaborateurs du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur de Clermont-Ferrand, Unité INSERM U1107.

I RÔLE DU CANAL TREK-2 DANS LES NEURONES DE DRG

TREK-2 contribue majoritairement à la conductance potassique de fond dans les neurones de DRG (Kang and Kim, 2006). En premier lieu, nous avons donc voulu déterminer quel était l'impact de la délétion du canal TREK-2 sur l'excitabilité des neurones sensoriels de DRG. Pour cela, nous avons enregistré en patch clamp les potentiels de repos membranaires de neurones en culture de DRG de souris sauvages et TREK-2^{-/-}. Les enregistrements ont été réalisés en configuration cellule entière, en courant imposé, et à température ambiante (~24 °C). Les neurones enregistrés sont de petit diamètre (<20 µm) et présentent un potentiel de repos stable pendant au moins deux minutes après la rupture du patch de membrane et le passage en configuration cellule entière.

Les neurones sauvages présentent en moyenne un potentiel de repos autour de -59mV et les neurones TREK-2^{-/-} ont un potentiel de repos moyen d'environ -43mV (Figure 34). La délétion du canal TREK-2 dépolarise de près de 15mV les neurones ($p < 0,01$, Mann Whitney). Cela suggère que lorsqu'il est exprimé dans les neurones de DRG, TREK-2 induit une hyperpolarisation susceptible de réduire l'excitabilité des fibres sensorielles.

Ces résultats sont cohérents avec les propriétés électrophysiologiques du canal ainsi qu'avec la littérature. Une étude récente a d'ailleurs rapporté que, dans les neurones de DRG de rat, la délétion du canal TREK-2 dépolarisait d'environ 10mV des cellules (Acosta et al., 2014).

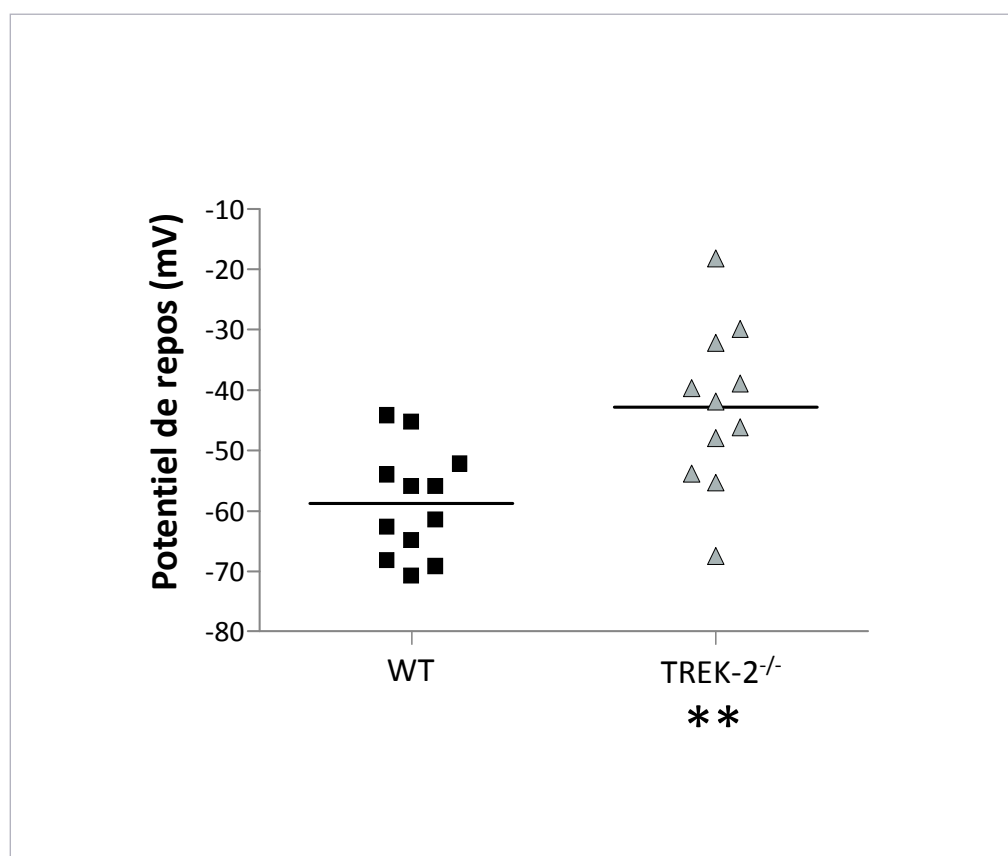


Figure 34 : Effet de la délétion du canal TREK-2 sur le potentiel de repos membranaire des neurones sensoriels de DRG. Potentiel de repos de neurones sensoriels de DRG WT (n=12 neurones) et TREK-2^{-/-} (n=11 neurones) mesurés par enregistrement patch-clamp en configuration cellule entière en courant imposé. La différence significative entre les souris WT et TREK-2^{-/-} est indiquée par : ** ($p < 0,01$). Test Mann Whitney.

II RÔLE DE TREK-2 DANS LA PERCEPTION THERMIQUE

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle du canal TREK-2 dans la perception thermique par les neurones de DRG. Nous avons utilisé deux approches complémentaires pour répondre à cette question. D'une part nous avons réalisé des cultures primaires de neurones sensoriels de DRG de souris sauvages et de souris TREK-2^{-/-} afin d'étudier l'impact de la délétion de TREK-2 sur leur thermosensibilité par imagerie calcique. D'autre part nous avons mesuré la sensibilité thermique des fibres C de ces mêmes souris par la technique d'enregistrement de nerf peau pour déterminer l'activité de fibres nerveuses unitaires en réponse à un stimulus thermique. L'impact de la délétion de TREK-2 et de l'ensemble des canaux TREK a été évalué sur la perception au chaud et au froid.

A. Impact de TREK-2 dans la perception au chaud

1. Étude sur des neurones sensoriels de DRG par imagerie calcique

Les neurones de DRG sont prélevés sur animal euthanasié puis mis en culture pendant deux jours avant utilisation. Nous mesurons, à l'aide du FURA-2-AM, les variations de calcium intracellulaire des neurones suite à l'augmentation de température afin de déterminer leur thermosensibilité. L'activité basale, soit le niveau de fluorescence basale, des cellules est mesurée pendant environ 1min, puis nous perfusions directement sur les cellules une solution de capsaïcine à 10 μ M pendant ~1min, pour activer les canaux TRPV1, qui sont des senseurs du chaud (Caterina and Julius, 2001). Après rinçage de la capsaïcine, le milieu de perfusion des cellules est réchauffé, passant de 30°C à 48°C en moins d'une minute. Nous avons pu mesurer, pour chaque génotype, la fraction de neurones sensibles à l'augmentation de la température et sensible ou insensible à la capsaïcine.

La fraction de neurones sensibles à une augmentation de la température augmente significativement avec la délétion de TREK-2, passant de ~50% chez les neurones de souris sauvages à 60% pour les neurones de DRG de souris TREK-2^{-/-} (Figure 35). La fraction de neurones sensibles au chaud uniquement, insensible à la capsaïcine, est significativement augmentée chez les souris TREK-2^{-/-} ($p < 0,01$, Test Chi2) et il en est de même pour la fraction de neurones sensibles à la fois au chaud et à la capsaïcine ($p < 0,05$, Test Chi2). La délétion du canal TREK-2 révèle deux populations de neurones qui, lorsque TREK-2 est présent, ne sont pas activés par le chaud. L'une d'elles est sensible à la capsaïcine et donc exprime le canal TRPV1, tandis que l'autre ne semble pas l'exprimer.

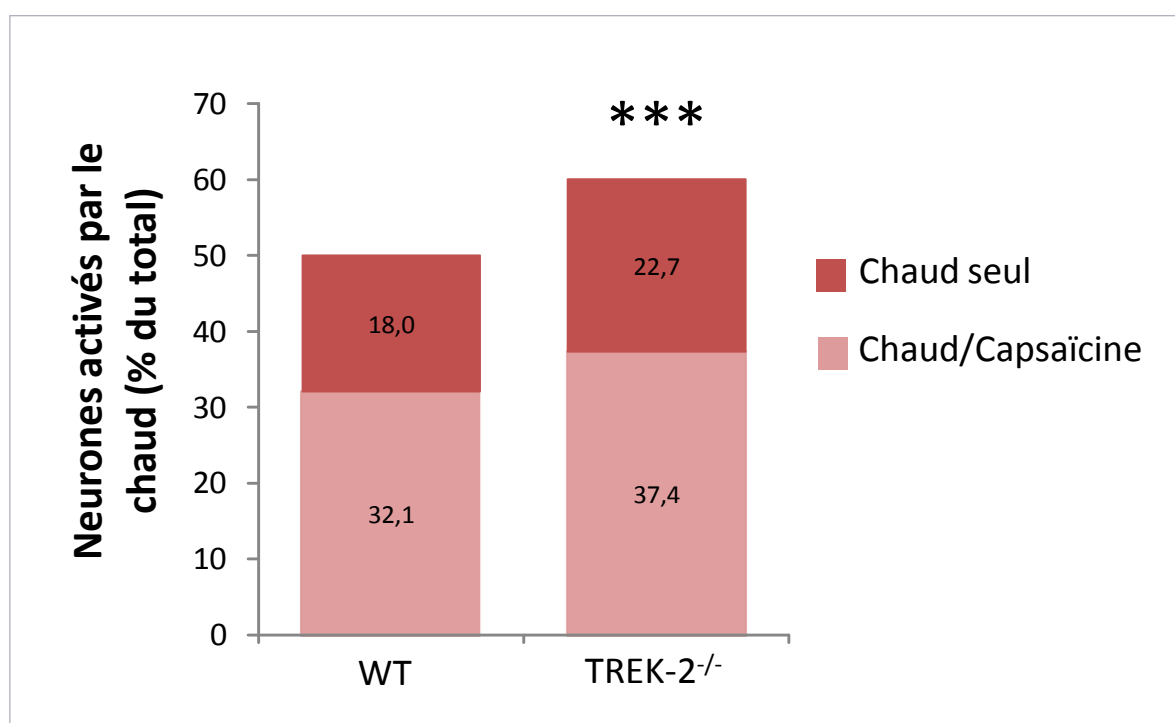


Figure 35 : Sensibilité au chaud des neurones sensoriels de DRG TREK-2^{-/-}. Fraction de neurones WT (n= 581 neurones testés sur 21 expériences, 6 animaux), et TREK-2^{-/-} (n=771 neurones testés sur 24 expériences, 6 souris) activés par une augmentation de la température de 30°C à 48°C et par une solution de capsaïcine 10μM. La différence significative entre les souris WT et TREK-2^{-/-} est indiquée par : *** ($p < 0,001$). Test Chi2.

2. Étude des fibres C nociceptives : enregistrements nerf-peau

Nous avons ensuite étudié par la technique de nerf peau les fibres nociceptives de type C activées par la température. Cette technique consiste à enregistrer l'activité de fibres nerveuses isolées en appliquant un stimulus directement sur son champ récepteur cutané (Reeh, 1986; Zimmermann et al., 2009). Pour identifier le champ récepteur de chaque fibre enregistrée, nous stimulons mécaniquement la peau jusqu'à déclencher la réponse d'une fibre. Nous isolons ensuite le champ récepteur de l'ensemble de la préparation à l'aide d'un cylindre métallique dans le but

de perfuser directement le milieu SIF (Synthetic Interstitial Fluid) à une température donnée seulement sur cette zone de la peau. Nous stimulons ensuite électriquement les terminaisons sensorielles du neurone qui innerve cette partie de la peau pour déterminer leur vitesse de conduction. Les fibres cutanées dont la vitesse de conduction correspond est inférieure à $1,5\text{m.s}^{-1}$ sont des fibres C. Par ces différents procédés, nous enregistrons donc uniquement des fibres C mécanosensibles (C-M), qui représentent près de 90% des fibres C innervant la peau (Wetzel et al., 2007). Pour chaque fibre, nous mesurons le seuil de sensibilité mécanique avec des filaments de von Frey calibrés. Les fibres dont le seuil de sensibilité est supérieur à 4 mN sont des fibres à haut seuil, essentiellement des fibres nociceptives. L'activité basale des fibres est enregistrée pendant au moins 1min à 30°C puis nous appliquons une rampe chaude, en chauffant le milieu de perfusion de la peau jusqu'à 50°C en 1 minute avant un retour à 30°C (Figure 36). En parallèle, nous avons mesuré la sensibilité au froid des fibres C. Nous avons pu déterminer la fraction, dans chaque génotype, de fibres C-M activées par le froid (CM-C), le chaud (CM-H) ou par les deux stimuli (C-MHC) et mesurer l'activité des fibres en réponse à chacun des stimuli, ainsi que leur seuil de sensibilité thermique au chaud et/ou au froid.

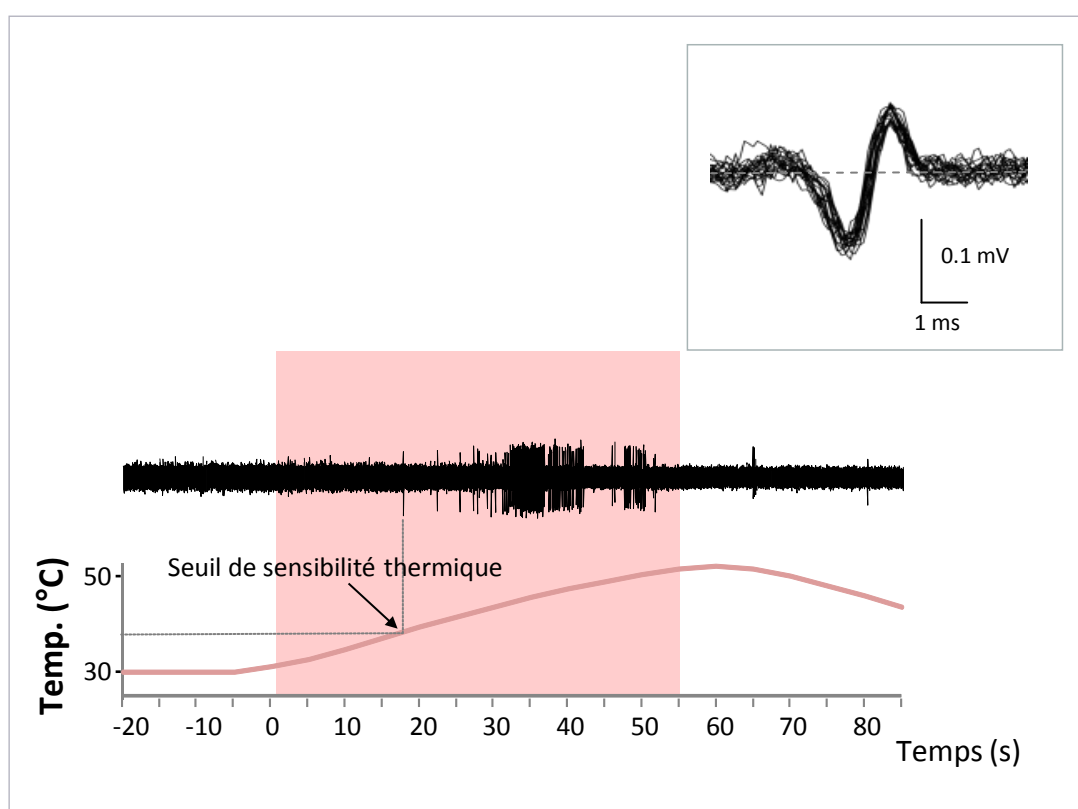


Figure 36 : Exemple d'enregistrement de l'activité d'une fibre C TREK-2^{-/-} en réponse au chaud. Trace représentative de l'enregistrement d'une fibre C TREK-2^{-/-} en réponse à une augmentation de la température de 30°C à 50°C . La fibre est considérée comme activée par le stimulus si sa fréquence de décharge est augmentée par ce dernier. Le seuil de sensibilité au chaud de la fibre correspond à la température pour laquelle on observe le changement de la fréquence de décharge (flèche), correspondant ici à la température du premier PA déchargé. L'insert représente les PAs détectés pour cette fibre (superposition).

Nous avons tout d'abord mesuré les seuils de sensibilité mécanique de chaque fibre enregistrée et nous n'avons noté aucune différence entre les deux génotypes, les valeurs médianes étant identiques pour les fibres sauvages et TREK-2^{-/-} (valeur médiane 11,4mN pour les deux génotypes, WT n= 37 fibres ; TREK-2^{-/-} n=43 fibres, p>0,05, test Mann Whitney).

Nous avons ensuite analysé la réponse induite par l'augmentation de température de 30°C à 50°C des fibres C-MH et C-MHC de chaque génotype (**Figure 37**). La fréquence de décharge de PAs en réponse au chaud est augmentée chez les souris TREK-2^{-/-} par rapport aux souris sauvages (**Figure 37 A**). Les fibres sauvages déchargent en moyenne 47 PAs en 60s, les fibres TREK-2^{-/-} ont une réponse moyenne de 57 PAs par minute.

De plus, les seuils de sensibilité au chaud des fibres sont plus bas chez les souris TREK-2^{-/-} (**Figure 37 B**). Les fibres TREK-2^{-/-} répondent à l'augmentation de température autour de 35,7°C tandis que les fibres sauvages sont actives en autour de 40,3°C (valeurs médianes).

La fréquence de décharge des potentiels d'action des fibres TREK-2^{-/-} pendant la rampe de température est supérieure à celle des fibres sauvages pour des températures en dessous de 40°C (entre 30°C et 40°C) (**Figure 37 B**). Par contre, il n'y a aucune différence visible entre les activités des fibres sauvages et TREK-2^{-/-} au-delà de 40°C (entre 40°C et 50°C) (**Figure 37 D**).

La fraction de fibres sensibles au chaud (C-MH et C-MHC), qui représente 56% des fibres C enregistrées chez les souris sauvages, est augmentée chez les souris TREK-2^{-/-} à 68% (**Figure 38 A**). Les fractions de fibres C-MH sont similaires pour les deux génotypes alors que la fraction de fibres C-MHC est fortement augmentée chez les souris KO. En effet, les souris sauvages comptent environ 15% de fibres CM-HC et cette fraction est doublée chez les souris TREK-2^{-/-} (p<0,01, Test Chi2).

L'absence du canal TREK-2 dans les fibres C induit donc une augmentation de la fraction de fibres sensibles au chaud en augmentant la fraction de fibres sensibles à la fois au chaud et au froid. On observe donc une nette diminution de la sélectivité thermique des fibres. Si l'on observe dans le détail l'activité des fibres en fonction de la température, on remarque qu'il y a plus de fibres C actives dans des gammes de chaud modéré chez les souris TREK-2^{-/-} par rapport aux souris sauvages. En effet, près de 80% des fibres C TREK-2^{-/-} sont actives entre 30°C et 40°C alors que seulement 50% des fibres sauvages sont activées dans ces gammes de température (**Figure 38**).

L'absence du canal TREK-2, en plus d'amplifier la réponse des fibres à l'augmentation de la température, augmente la fraction de fibres activées par ce stimulus. Cependant l'effet de la délétion de TREK-2 sur l'activité des fibres n'est visible que dans des gammes de température modérées, soit entre 30°C et 40°C.

L'ensemble de ces résultats montrent que le canal TREK-2 est un puissant modulateur de l'activité des fibres C en réponse au chaud jusqu'à 40°C.

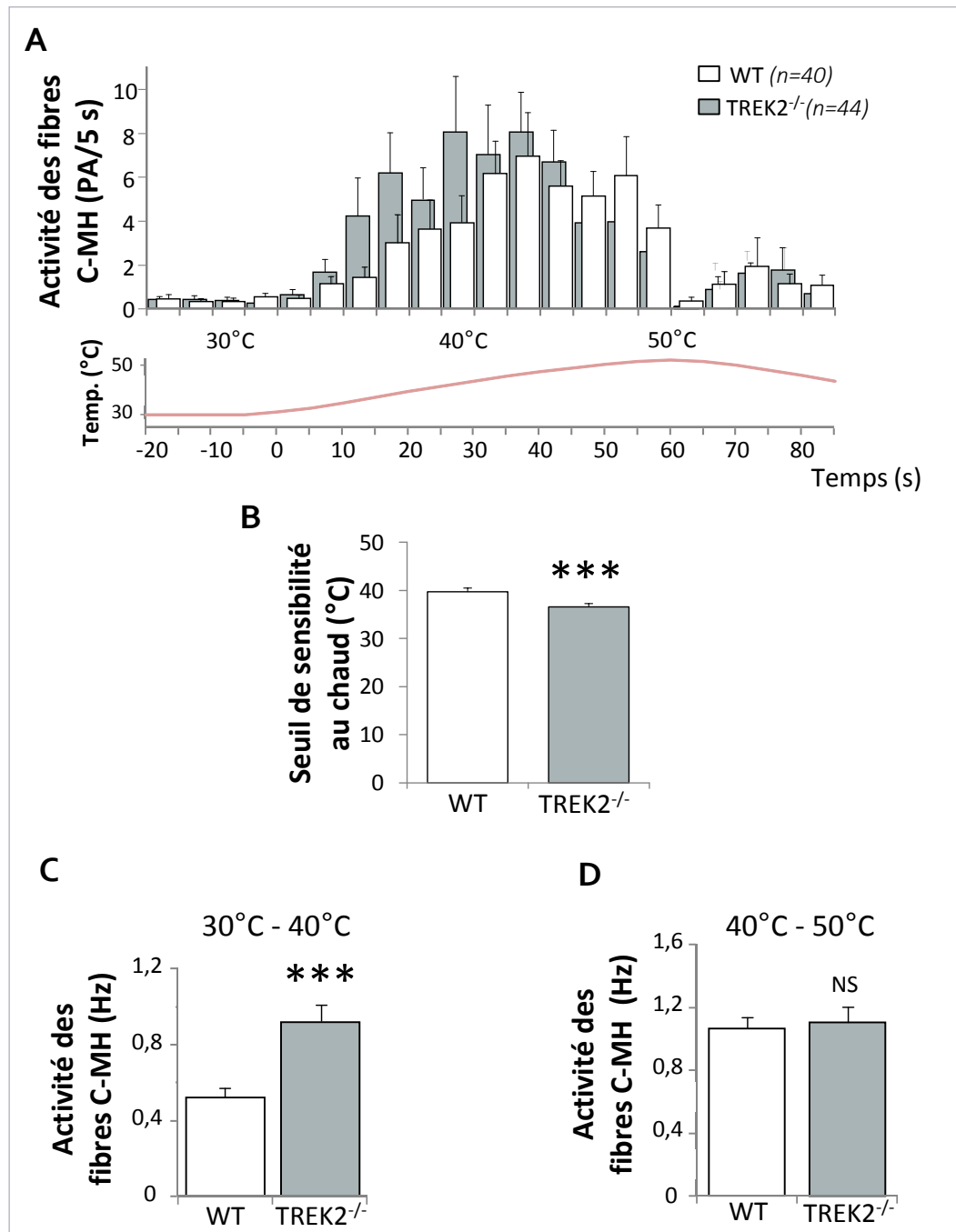


Figure 37 : Activité des fibres C TREK-2^{-/-} en réponse au chaud. **A.** Réponse au chaud des fibres TREK-2^{-/-}. Nombre de PAs déchargés par 5s par les fibres WT (blanc, n=40 fibres) et TREK-2^{-/-} (gris, n=44 fibres) en réponse à une augmentation de la température de 30°C à 50°C. **B.** Seuils de sensibilité au chaud des fibres. Seuil de sensibilité moyen des fibres C WT et TREK-2^{-/-} qui correspond à la température pour laquelle la fibre présente une augmentation de sa fréquence de décharge. **C.** Activité des fibres C en réponse au chaud modéré. Réponse des fibres C sensibles au chaud entre 30°C et 40°C (PA.s⁻¹). **D.** Activité des fibres C en réponse au chaud nocif. Réponse des fibres C sensibles au chaud entre 40°C et 50°C (PA.s⁻¹). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm l'erreur-type. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-2^{-/-} sont marquées par : *** ($p < 0,001$). Test Mann Whitney (seuils) et Wilcoxon pour échantillons appariés (activité des fibres).

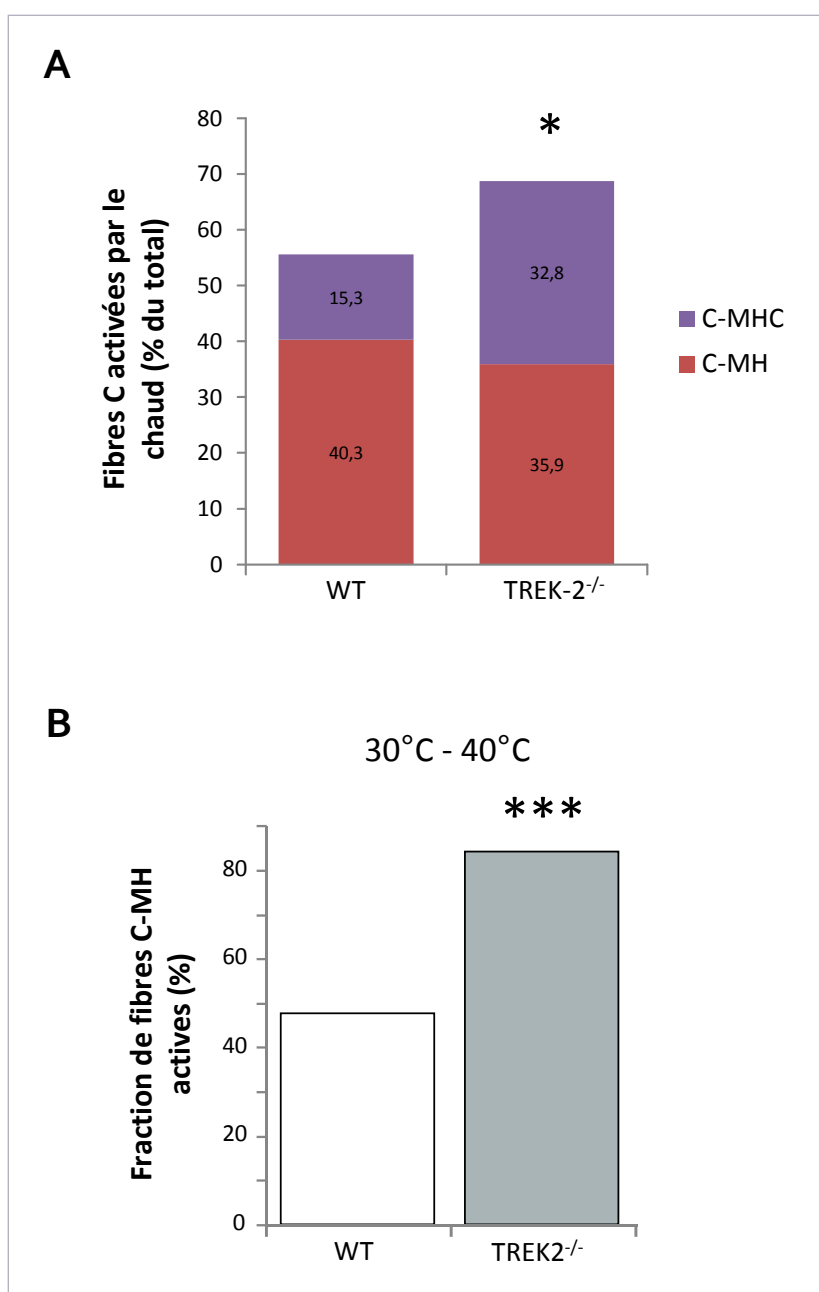


Figure 38 : Effet de la délétion du canal TREK-2 sur la fraction de fibres C sensibles au chaud. **A.** Fraction de fibres C TREK-2^{-/-} activées par le chaud. Pourcentage de fibres C sensibles au chaud (C-MH) et à la fois au froid et au chaud (C-MHC) de souris WT (n=72 fibres testées sur 31 expériences, 12 souris) et TREK-2^{-/-} (n=64 fibres testées sur 27 expériences, 9 souris). **B.** Fraction de fibres actives dans des gammes de chaud modéré. Pourcentage de fibres C sensibles au chaud actives entre 30°C et 40°C. La différence significative entre les souris WT et TREK-2^{-/-} est indiquée par : * (p<0,05) et *** (p<0,001). Test Chi2.

B. Rôle du canal TREK-2 dans la perception du froid

Le canal TREK-2 est un canal thermosensible dont l'activité diminue avec la diminution de la température, nous avons cherché à déterminer si le canal est également impliqué dans la perception au froid. Pour cela nous avons utilisé les mêmes approches d'imagerie calcique et d'enregistrements nerf-peau que pour l'étude des effets du canal TREK-2 dans la perception de la chaleur par les neurones sensoriels et les fibres C-nociceptive.

1. Étude des réponses au froid des neurones sensoriels de DRG par imagerie calcique

Nous avons évalué par imagerie calcique la fraction de neurones de DRG de souris sauvages et TREK-2^{-/-} qui sont sensibles au froid et/ou au menthol, l'agoniste des canaux TRPM8. Les canaux TRPM8 sont des senseurs essentiels dans la perception du froid (Bautista et al., 2007). Les neurones en culture ont été perfusés avec une solution de menthol à 500μM puis, après rinçage, la température du milieu de perfusion des cellules a été abaissée jusqu'à atteindre 10°C.

Environ 22% des neurones sauvages sont activés par le froid, comme le montre l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique (augmentation de la fluorescence du Fura-2) lorsque la température de perfusion est abaissée à 10°C (Figure 39), Cette valeur correspond aux données précédemment publiées par le laboratoire (Noël et al., 2009). La fraction de neurones sensible au froid est augmentée chez les TREK-2^{-/-} puisque plus de 28% des neurones répondent au froid. Le pourcentage de neurones sensibles au froid et au menthol est identique pour les deux génotypes et c'est la fraction de neurones sensibles au froid et insensible au menthol qui est augmentée chez les souris TREK-2^{-/-} ($P < 0,05$, Test Chi2). Ces observations indiquent que la délétion de TREK-2 révèle une population de neurones activés par le froid mais qui sont insensibles au menthol. Il est possible que ces neurones n'expriment pas, ou à très faible niveau d'expression, le canal TRPM8.

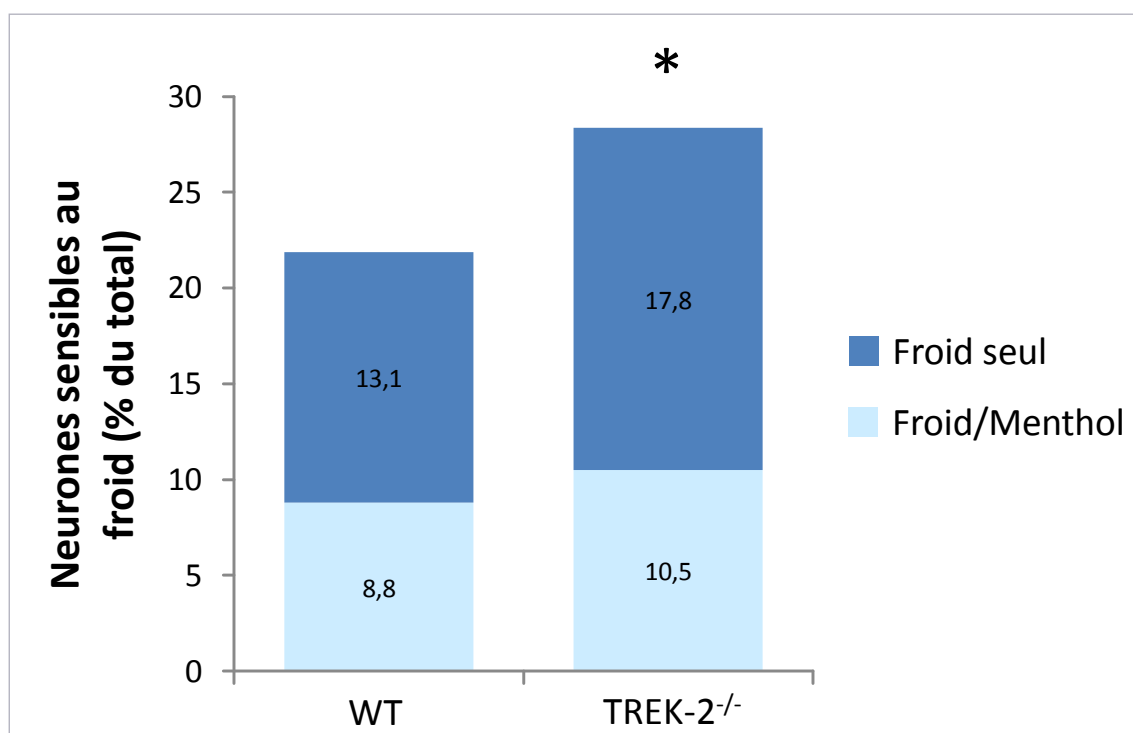


Figure 39 : Sensibilité au froid des neurones sensoriels de DRG TREK-2^{-/-}. Fraction de neurones WT (n= 581 neurones testés sur 21 expériences, 6 animaux) et TREK-2^{-/-} (n=771 neurones testés sur 24 expériences, 6 souris) activés par une diminution de la température de 30°C à 10°C et par une solution de menthol 500µM. La différence significative entre les souris WT et TREK-2^{-/-} est indiquée par : * ($p < 0,05$). Test Chi2.

2. Étude de la sensibilité au froid des fibres C nociceptives : enregistrements nerf-peau

Nous avons ensuite mesuré l'activité des fibres C de chaque génotype, sauvage et TREK-2^{-/-}, en réponse à une diminution de la température, de 30°C à 10°C. L'activité basale des fibres est enregistrée pendant au moins 1min à 30°C puis nous appliquons une rampe froide en abaissant la température jusqu'à atteindre 10°C en 1 minute 30 secondes pour rétablir rapidement la température de perfusion de la peau à 30°C. Un exemple de l'enregistrement d'une fibre C TREK-2^{-/-} en réponse au froid est présenté ci-dessous (Figure 40).

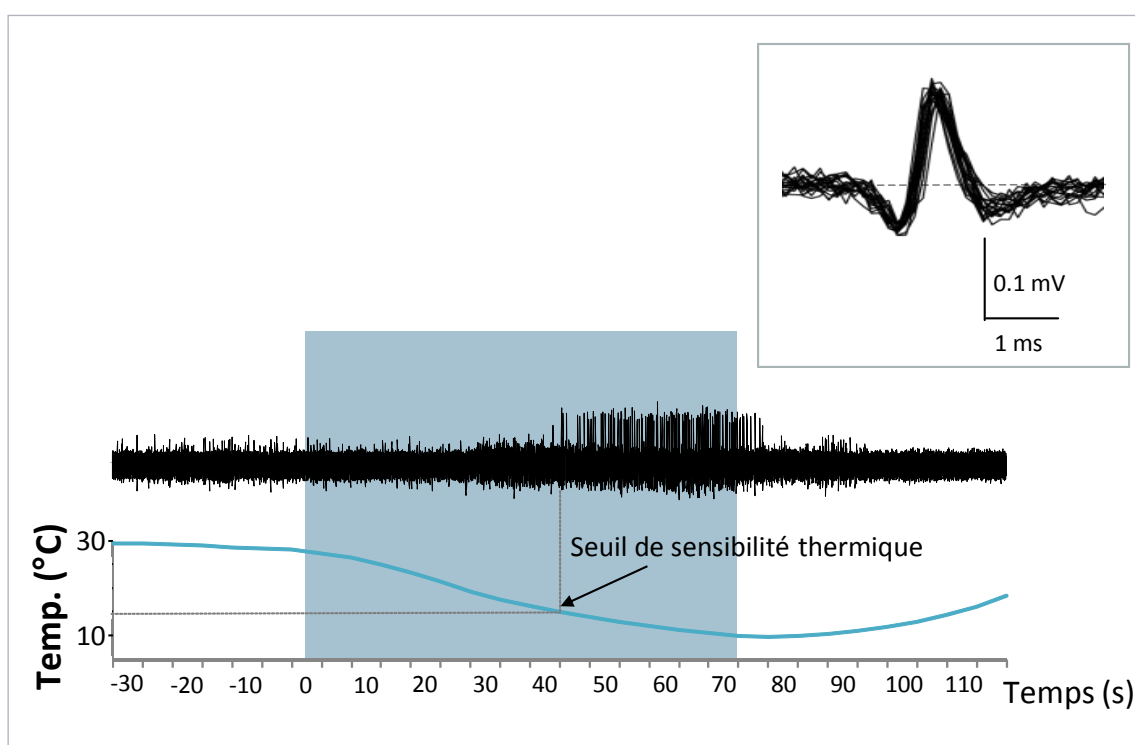


Figure 40 : Exemple d'enregistrement de l'activité d'une fibre C TREK-2^{-/-} en réponse au froid. Trace représentative de l'enregistrement d'une fibre C TREK-2^{-/-} en réponse à une diminution de la température de 30°C à 10°C. La fibre est considérée comme activée par le stimulus si sa fréquence de décharge est augmentée par ce dernier. Le seuil de sensibilité au froid de la fibre correspond à la température pour laquelle on observe le changement de la fréquence de décharge (flèche). L'insert représente les PAs détectés pour cette fibre (superposition).

La réponse des fibres C-nociceptives au froid est augmentée en absence du canal TREK-2 par rapport aux fibres C-nociceptives sauvages (Figure 41 A). Lors d'un refroidissement de la température de 30°C à 10°C, les fibres sauvages déclenchent en moyenne 37 PAs en une minute alors que les fibres TREK-2^{-/-} déclenchent en moyenne 73 PAs en une minute. La fréquence des PAs des fibres C TREK-2^{-/-} est notamment supérieure à celle des fibres C sauvages pour des températures modérées entre 30°C et 21°C (Figure 41 C).

Les valeurs médianes de seuil de sensibilité des fibres C au froid, qui correspond à la température de déclenchement du premier PA lors de la réponse au froid, ne sont pas significativement différents pour les fibres des deux génotypes (Figure 41 B).

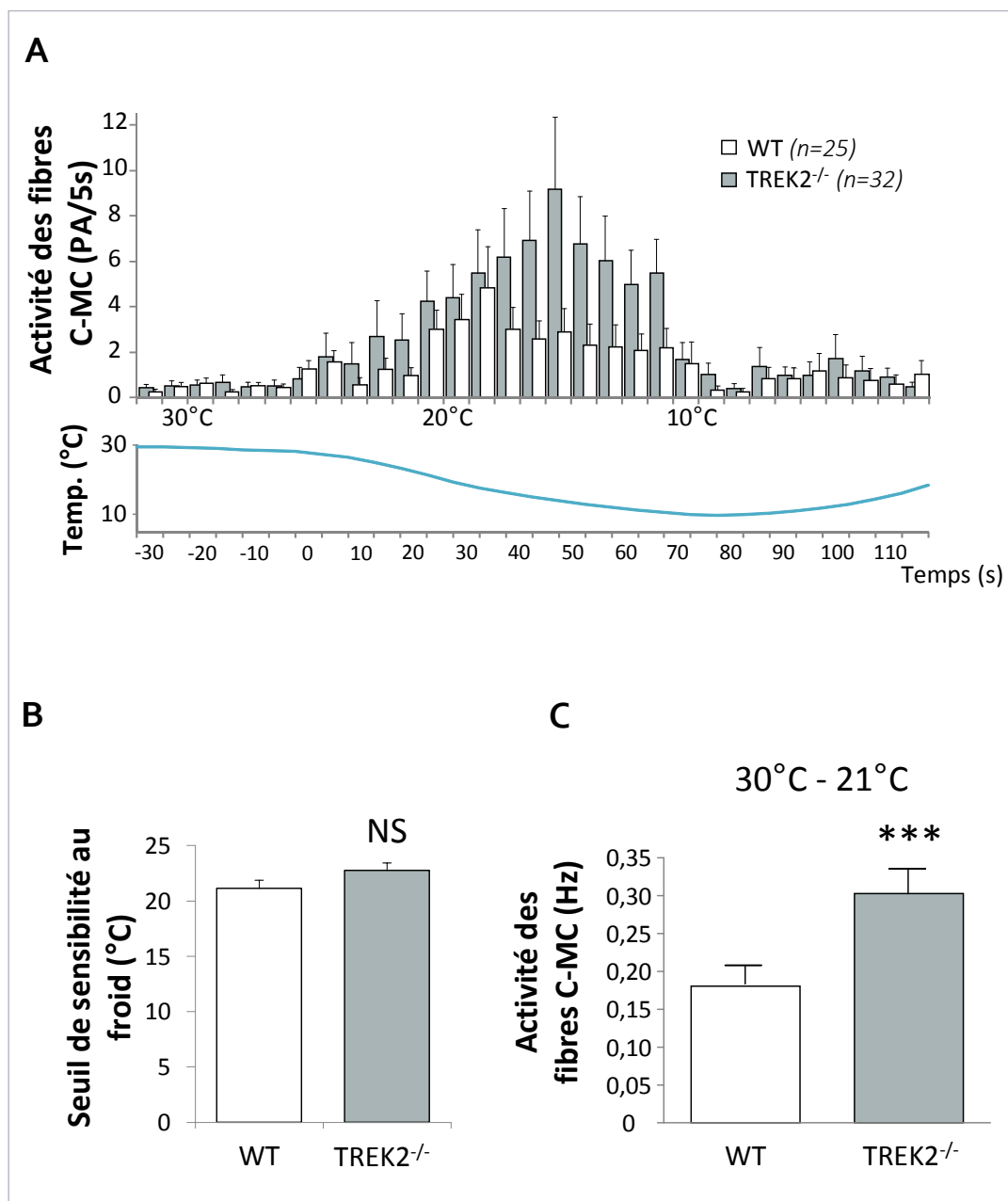


Figure 41 : Activité des fibres C TREK-2^{-/-} en réponse au froid. **A.** Réponse au froid des fibres TREK-2^{-/-}. Nombre de PAs moyen déchargés par 5s par les fibres WT (blanc, n=25 fibres) et TREK-2^{-/-} (gris, n=32 fibres) en réponse à une diminution de la température de 30°C à 10°C. **B.** Seuils de sensibilité au froid des fibres C. **C.** Seuils de sensibilité moyen au froid des fibres C WT et TREK-2^{-/-}, qui correspond à la température pour laquelle la fibre présente une augmentation de sa fréquence de décharge. **C.** Activité des fibres C en réponse au froid modéré. Réponse des fibres C sensibles au froid entre 30°C et 21°C (PA.s⁻¹). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes +/- l'erreur-type. NS: non significatif. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-2^{-/-} sont marquées par : *** (p<0,001). Test Mann Whitney (seuils) et Wilcoxon pour échantillons appariés (réponse au froid).

En accord avec de précédentes études (Koltzenburg et al., 1997; Noël et al., 2009), la fraction de fibres C des souris sauvages qui répondent au refroidissement est d'environ 35%. Les souris TREK-2^{-/-} ont près de 50% de fibres activées par le froid (Figure 42 A). La fraction de fibres C-MHC est doublée chez les souris KO par rapport aux souris sauvages alors que la fraction de fibres C-MC est comparable dans les deux génotypes. De plus, il y a significativement plus de fibres C TREK-2^{-/-} actives entre 30°C et 21°C, dans des gammes de froid modéré, que de fibres C sauvages (Figure 42 B).

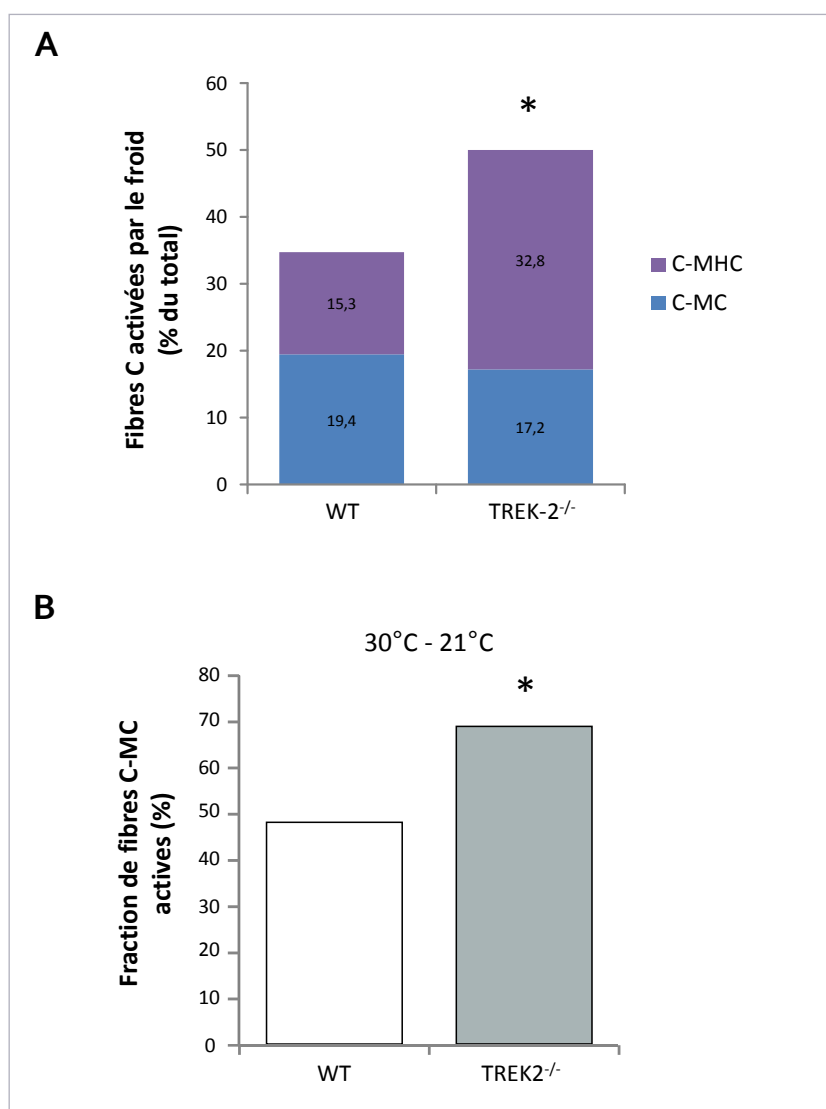


Figure 42 : Effet de la délétion du canal TREK-2 sur la fraction de fibres C sensibles au froid. A. Fraction de fibres C TREK-2^{-/-} activées par le chaud. Pourcentage de fibres C sensibles au froid (C-MC) et à la fois au froid et au chaud (C-MHC) de souris WT (n=72 fibres testées sur 31 expériences, 12 souris) et TREK-2^{-/-} (n=64 fibres testées sur 27 expériences, 9 souris). B. Fraction de fibres sensibles au froid actives dans des gammes de froid modéré. Pourcentage de fibres C WT (n=25 fibres) et TREK-2^{-/-} (n=32) sensibles au froid actives entre 30°C et 21°C. La différence significative entre les souris WT et TREK-2^{-/-} est indiquée par : * ($p < 0,05$). Test Chi2.

Ces observations montrent que le canal TREK-2 participe à la perception au froid et qu'il module la réponse au froid des fibres C périphériques à des températures modérées, entre 30°C et 21°C.

Par cette étude, nous avons donc montré que le canal TREK-2 module la perception thermique des nocicepteurs cutanés. De façon intéressante, nous avons observé que l'activité de TREK-2 dans la thermo perception est complémentaire de celle déjà rapportée pour les canaux TREK-1 et TRAAK car, contrairement à TREK-1 et TRAAK, TREK-2 intervient dans la perception de températures non nocives, entre 30°C et 40°C pour le chaud et 21°C et 30°C pour le froid. L'ensemble des canaux TREK contribuent donc à la perception thermique dans des gammes de température différentes.

III ÉTUDE DES SENSIBILITÉS THERMIQUES DES SOURIS TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}

J'ai ensuite examiné, dans les mêmes conditions que pour l'étude des souris TREK-2^{-/-}, la thermosensibilité des neurones de DRG et des fibres nociceptives cutanées des souris délétées pour l'ensemble des canaux TREK, les souris triple knockout TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}.

A. Étude de la perception au chaud des neurones sensoriels des souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}.

L'absence des trois canaux de la sous-famille TREK augmente la fraction de neurones de DRG en culture activés par le chaud entre 30°C et 50°C (**Figure 43**). Environ 57% de neurones de DRG sont sensibles au chaud chez les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} ce qui est comparable aux résultats obtenus avec les souris TREK-2^{-/-}. Il n'y aurait donc pas d'effet cumulatif de la délétion des trois canaux pour la sensibilité au chaud ce qui suggère qu'ils sont exprimés dans les mêmes cellules et qu'il n'y a pas de compensation d'expression des canaux dans les souris simple knockout. La fraction de neurones sensibles au chaud mais insensibles à la capsaïcine est augmentée, signifiant qu'il s'agit probablement de neurones qui n'expriment pas TRPV1, alors que leur sensibilité au chaud est révélée par l'absence des canaux TREK dans la souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Les mécanismes de sensibilité au chaud qui n'impliquent pas les canaux TRPV1 sont encore inconnus.

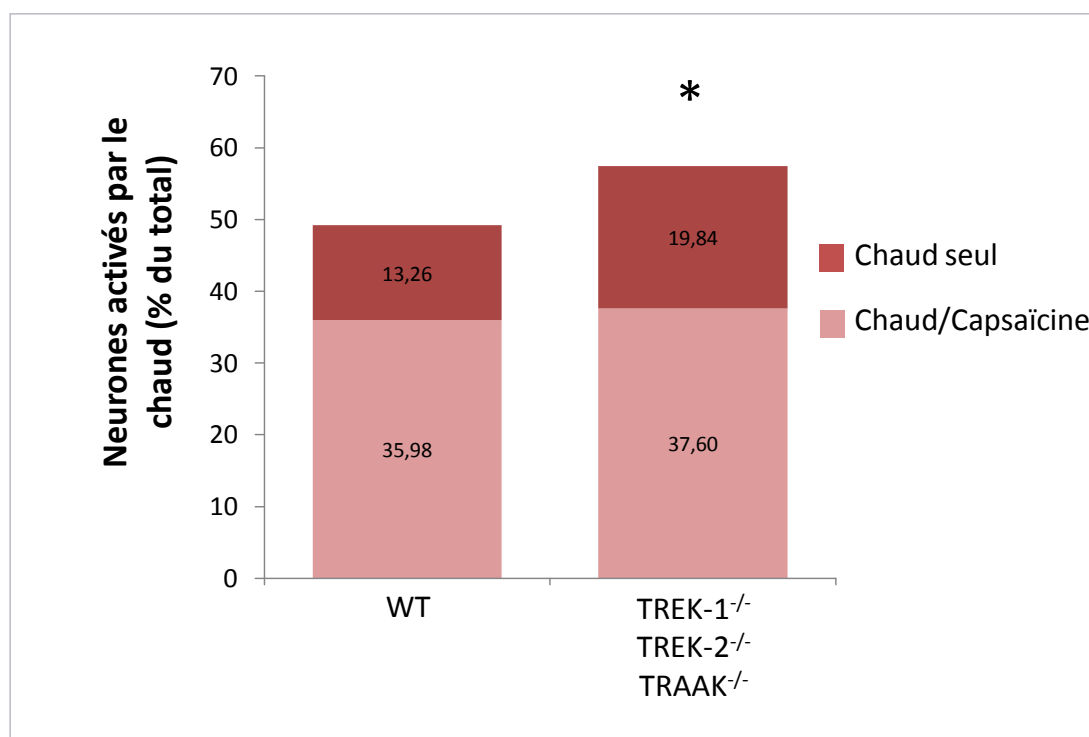


Figure 43 : Sensibilité au chaud des neurones sensoriels de DRG TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Fraction de neurones WT (n= 264 neurones testés sur 22 expériences, 10 animaux), et TREK-2^{-/-} (n=383 neurones testés sur 29 expériences, 10 souris) activés par une augmentation de la température de 30°C à 48°C et par une solution de capsaïcine 10μM. La différence significative entre les souris WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} est indiquée par : * (p<0,05). Test Chi2.

Les fibres C TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} répondent plus fortement à l'augmentation de température que les fibres sauvages (Figure 44 A). Elles ont également un seuil de sensibilité plus bas (~37°C, valeur médiane) que les fibres C des souris sauvages, (Figure 44 B). Les réponses des fibres C TREK-1^{-/-}- TREK-2^{-/-}- TRAAK^{-/-} sont supérieures aux fibres C sauvages sur l'ensemble de la gamme de températures étudiée, entre 30°C et 50°C (Figure 44 C et D). L'absence des canaux TREK a donc un impact sur la perception du chaud à des températures modérées et nocives.

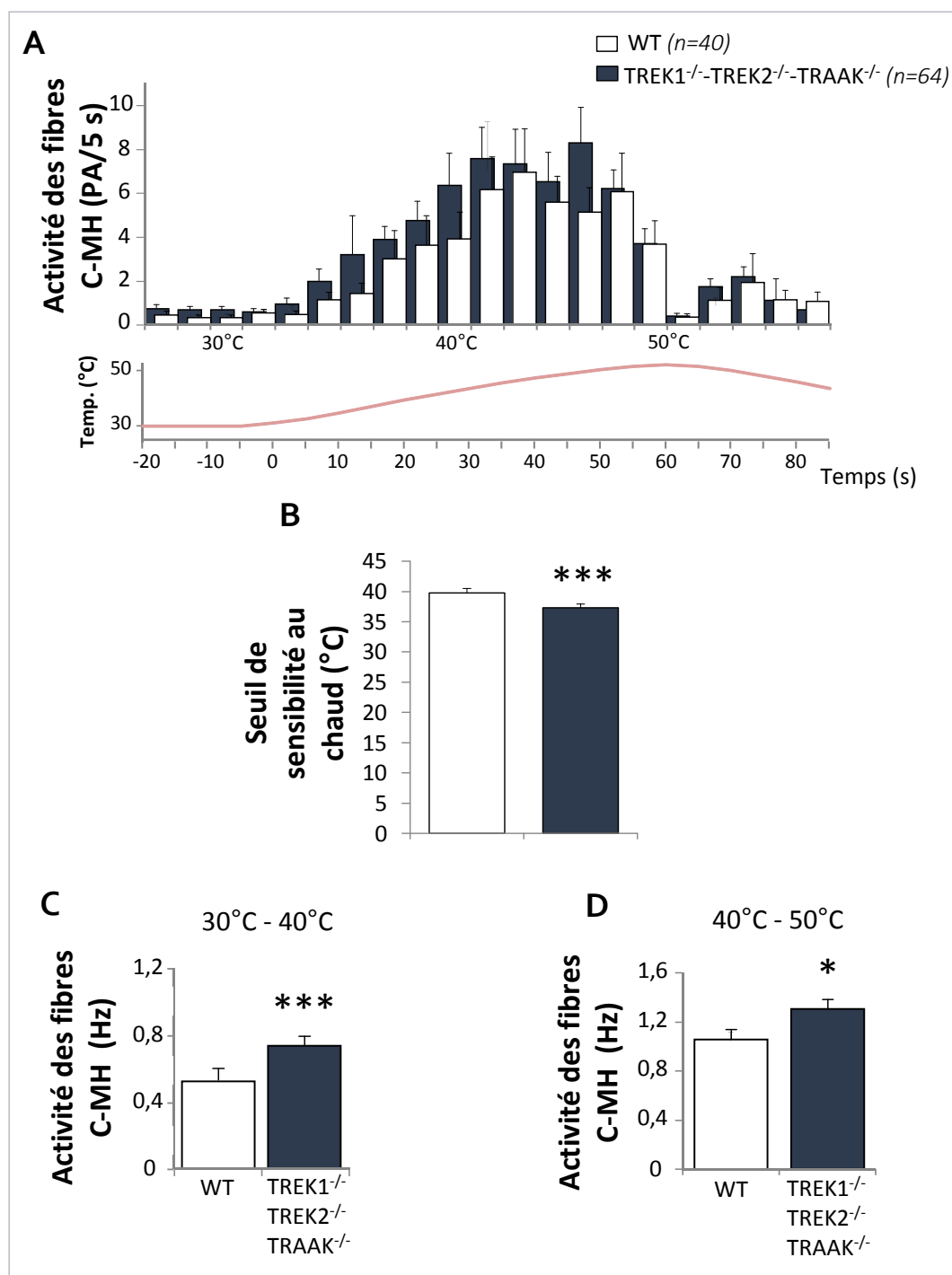


Figure 44 : Activité des fibres C TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAAK^{-/-} en réponse au chaud. **A.** Réponse au chaud des fibres TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAAK^{-/-}. Nombre de PAs moyen déchargés par 5s par les fibres C WT (blanc, n=40 fibres) et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAAK^{-/-} (bleu, n=64 fibres) en réponse à une augmentation de la température de 30°C à 50°C. **B.** Seuils de sensibilité au chaud des fibres C-MH. Seuil de sensibilité moyen au chaud des fibres C WT et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAAK^{-/-}, qui correspond à la température pour laquelle la fibre présente une augmentation de sa fréquence de décharge. **C.** Activité des fibres C en réponse au chaud modéré. Réponse des fibres C sensibles au chaud entre 30°C et 40°C (PA.s⁻¹). **D.** Activité des fibres C en réponse au chaud nocif. Réponse des fibres C sensibles au chaud entre 40°C et 50°C (PA.s⁻¹). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm l'erreur-type. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAAK^{-/-} sont marquées par : * ($p<0,05$) et *** ($p<0,001$). Tests Mann Whitney (seuils) et Wilcoxon (réponse au chaud).

L'absence des canaux TREK augmente la fraction de fibres C nociceptives cutanées activées par la température de 30°C à 50°C (Figure 45 A). La fraction de fibres C-MH est similaire pour les deux génotypes alors que la fraction de fibres C-MHC est augmentée chez les souris KO. Comme nous avons pu l'observer pour les neurones de DRG, la délétion de l'ensemble des canaux TREK n'a pas d'effet cumulatif par rapport à la délétion du canal TREK-2 seul puisque les fractions de fibres sensibles au chaud sont comparables pour ces deux génotypes. On observe, comme chez les souris TREK-2^{-/-}, que c'est la fraction de fibres actives au-dessous de 40°C qui est nettement augmentée par rapport aux sauvages (Figure 45 B).

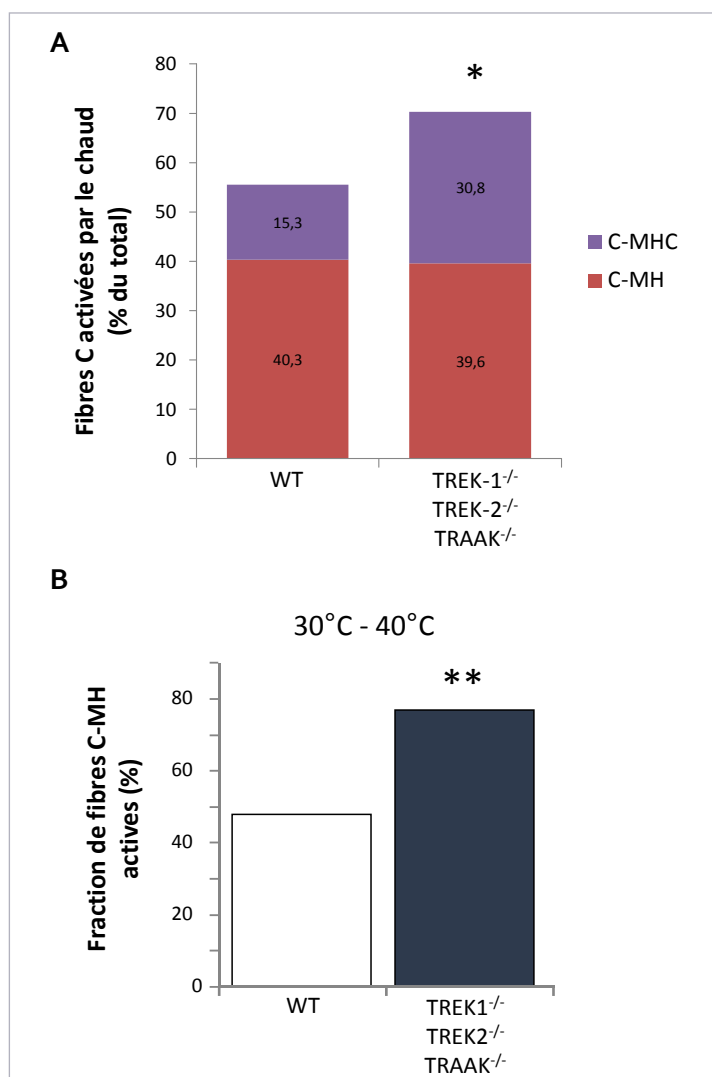


Figure 45 : Effet de la délétion des canaux TREK sur la fraction de fibres C sensibles au chaud. **A.** Fraction de fibres C TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAACK^{-/-} activées par le chaud. Pourcentage de fibres C sensibles au chaud (C-MH) et à la fois au froid et au chaud (C-MHC) de souris WT (n=72 fibres testées sur 31 expériences, 12 souris) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAACK^{-/-} (n=91 fibres testées sur 33 expériences, 13 souris). **B.** Fraction de fibres sensibles au chaud actives dans des gammes de chaud modéré. Pourcentage de fibres C WT (n=40 fibres) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAACK^{-/-} (n=64) sensibles au chaud actives entre 30°C et 40°C. La différence significative entre les souris WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAACK^{-/-} est indiquée par : * (p<0,05) et ** (p<0,01). Test Chi2.

B. Étude de la perception au froid des neurones sensoriels des souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}

Par imagerie calcique, nous avons observé que la fraction de neurones sensoriels de DRG TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} activés par le froid est augmentée par rapport aux neurones sauvages (Figure 46). Cette augmentation concerne à la fois les neurones DRG sensibles au menthol que les neurones DRG insensibles au menthol, qui n'expriment probablement pas ou à un faible niveau le canal TRPM8 ($P < 0,05$, Test Chi2).

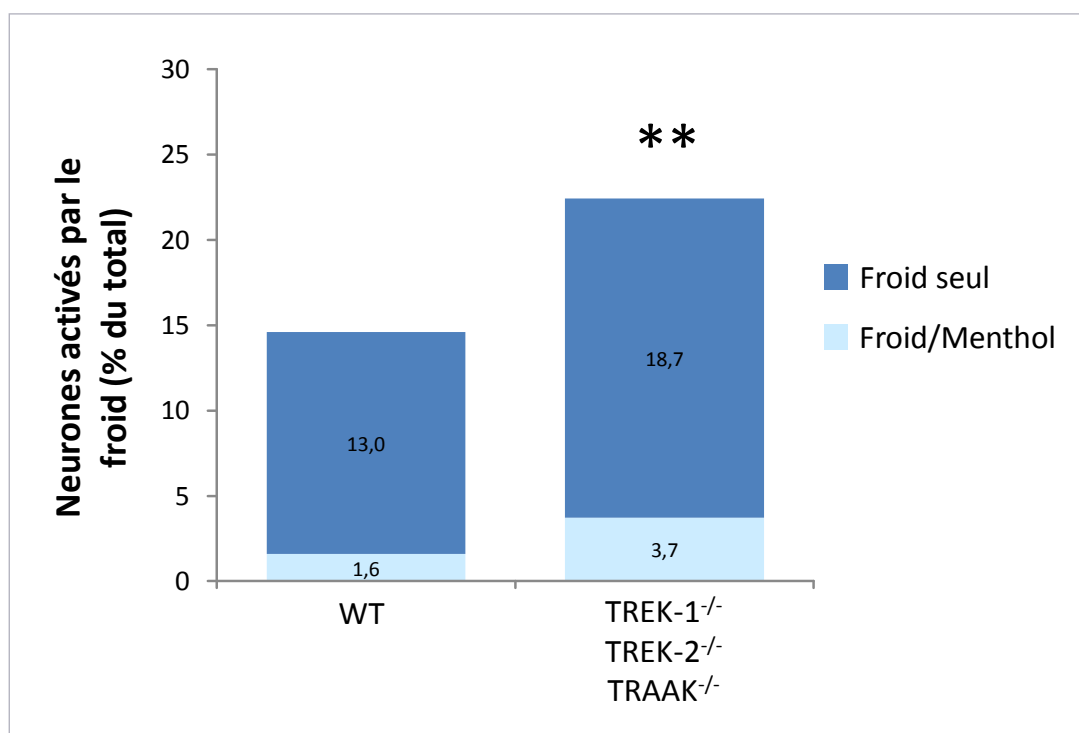


Figure 46 : Sensibilité au froid des neurones sensoriels de DRG TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Fraction de neurones WT (n= 315 neurones testés sur 26 expériences, 10 animaux) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} (n=348 neurones testés sur 28 expériences, 10 souris) activés par une diminution de la température de 30°C à 10°C et une solution de menthol 500μM. La différence significative entre les souris WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} est indiquée par : ** ($p < 0,01$). Test Chi2.

L'enregistrement de l'activité des fibres C nociceptives cutanées par la technique de nerf-peau montrent que la fréquence de décharge des fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} en réponse à la baisse de température de 30°C à 10°C est significativement supérieure à celle des fibres sauvages (Figure 47 A). Toutefois, les seuils de sensibilité au froid ne sont pas modifiés sur les fibres KO (Figure 47 B). L'activité des fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} entre 30°C et 21°C est sensiblement supérieure à celle des fibres sauvages (Figure 47 C). Cependant, nous n'observons pas de différenciation de l'activité des fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} en fonction des gammes de température puisque leur réponse au froid est toujours supérieure à celle des souris sauvages que ce soit dans des gammes de froid modéré ou nocif.

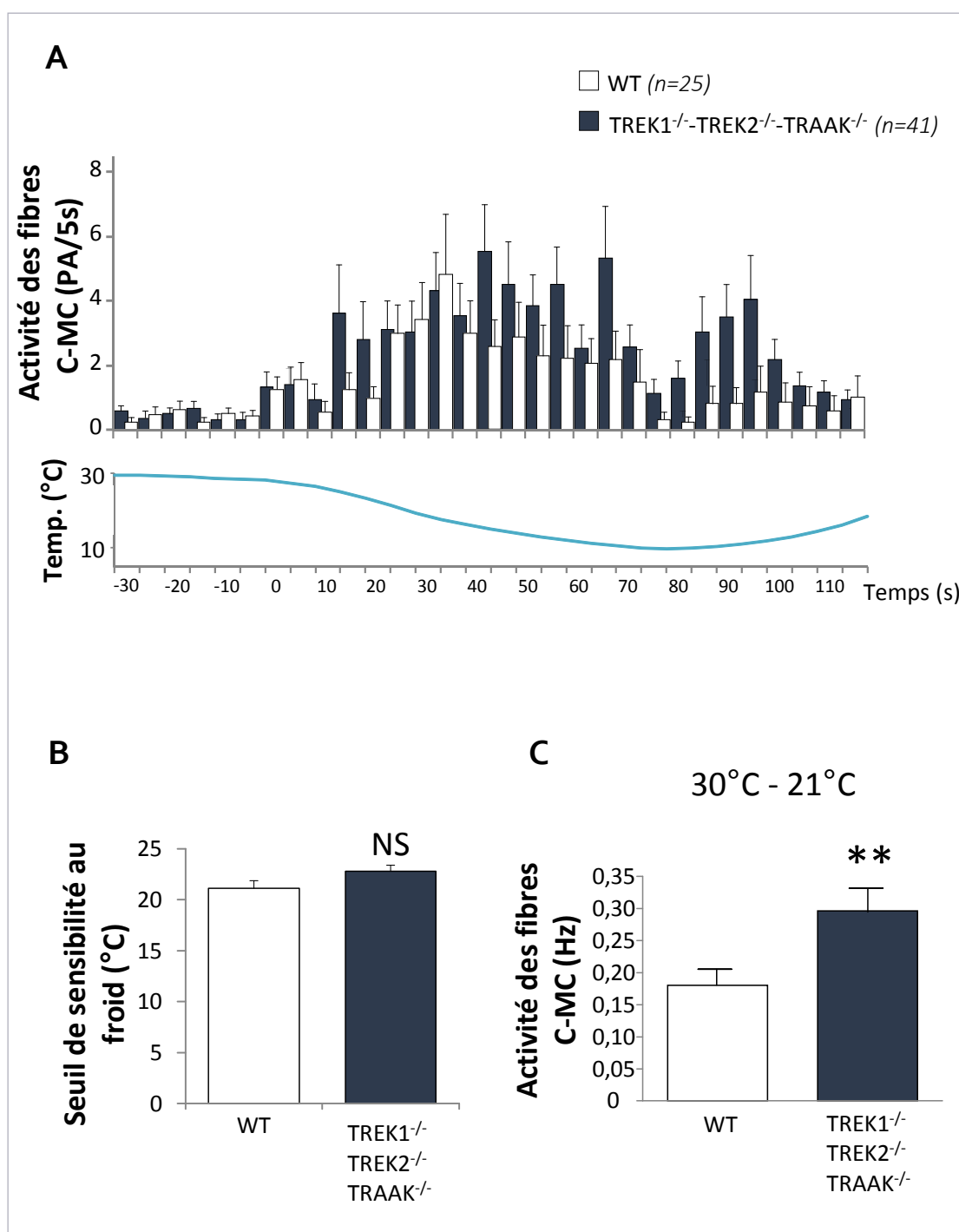


Figure 47 : Activité des fibres C TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} en réponse au froid. **A.** Réponse au froid des fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Nombre de PAs moyen déchargés par 5s par les fibres WT (blanc, n=25 fibres) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} (bleu, n=41 fibres) en réponse à une diminution de la température de 30°C à 10°C. **B.** Seuils de sensibilité au froid des fibres C. Seuil de sensibilité moyen au froid des fibres C WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} qui correspond à la température pour laquelle la fibre présente une augmentation de sa fréquence de décharge. **C.** Activité des fibres C en réponse au froid modéré. Réponse des fibres C sensibles au froid entre 30°C et 21°C (PA.s⁻¹). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes +/- l'erreur-type. NS: non significatif. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-2^{-/-} sont marquées par : ** (p<0,01). Test Mann Whitney (seuils) et Wilcoxon pour échantillons appariés (réponse au chaud).

La délétion des canaux TREK augmente la fraction de fibres activées par une baisse de la température de 30°C à 10°C (Figure 48 A). Les fractions de fibres C-MC sont semblables dans les deux génotypes, et ce sont donc les fibres C-MHC qui augmentent significativement chez les KO, indiquant une perte de la spécificité thermique des fibres. On observe qu'une grande majorité des fibres C TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} sensibles au froid sont actives pour des températures non nocives, entre 30°C et 21°C, contrairement aux fibres sauvages pour lesquelles seules 50% sont actives dans ces gammes de température (Figure 48 B).

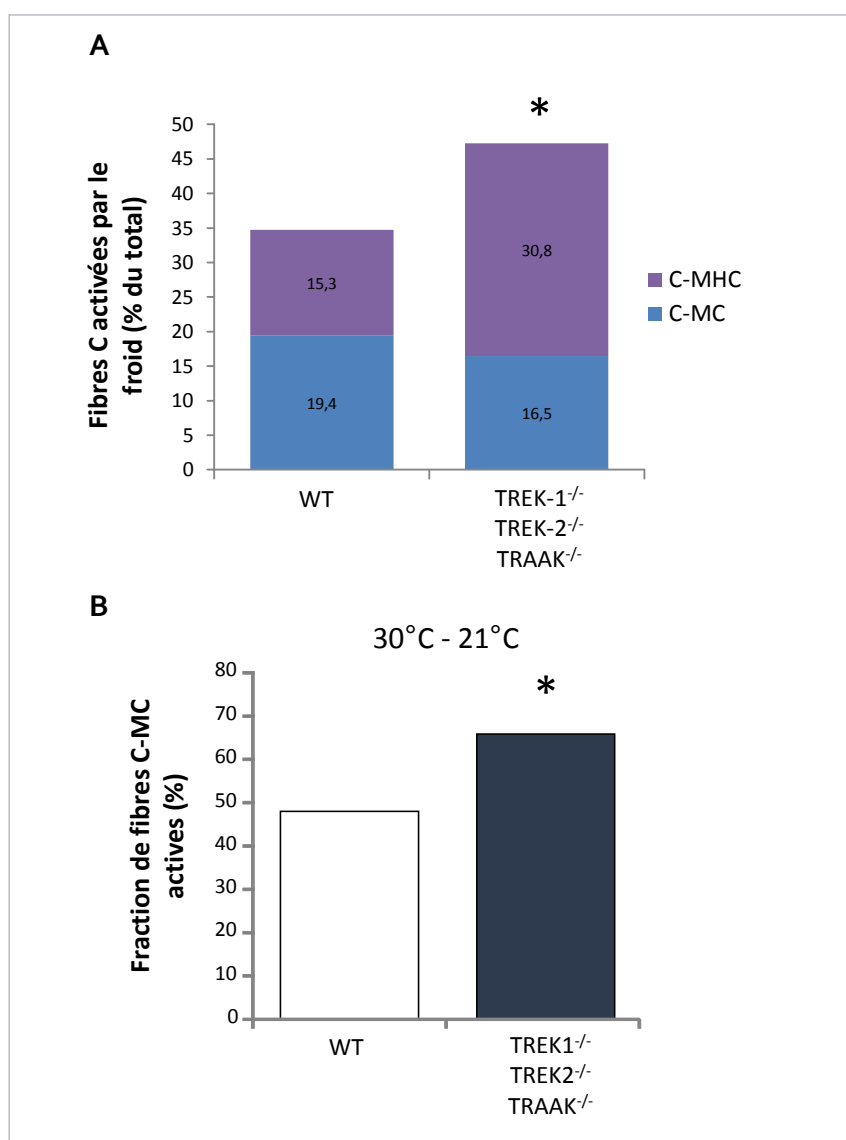


Figure 48 : Effet de la délétion des canaux TREK sur la fraction de fibres C sensibles au froid. A. Fraction de fibres C TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} activées par le froid. Pourcentage de fibres C sensibles au froid (C-MC) et à la fois au froid et au chaud (C-MHC) de souris WT (n=72 fibres testées sur 31 expériences, 12 souris) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} (n=91 fibres testées sur 33 expériences, 13 souris). B. Fraction de fibres sensibles au froid actives dans des gammes de froid modéré. Pourcentage de fibres C WT (n=25 fibres) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} (n=41) sensibles au froid actives entre 30°C et 21°C. La différence significative entre les souris WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} est indiquée par : * (p<0,05). Test Chi2.

L'ensemble de ces résultats confirment nos observations avec les souris TREK-2 ainsi que les études que nous avons publiées avec les souris TREK-1^{-/-} et TRAAK^{-/-} puisque nous montrons que les trois canaux de la sous-famille TREK sont impliqués dans la perception du chaud. L'activité des canaux TREK module la réponse des neurones aux stimuli thermiques et la perception de la température. L'étude des souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} conforte nos observations précédentes qui suggéraient un rôle complémentaire des canaux TREK dans la perception thermique. Alors que la délétion du canal TREK-2 n'affecte que la perception des températures froides et chaudes non douloureuses, l'absence des canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK altère la perception thermique des températures modérées et nocives. Le canal TREK-2 aurait donc un rôle essentiel dans la perception de températures modérées alors que les canaux TREK-1 et TRAAK interviennent dans la perception de températures nocives.

IV RÔLE DE TREK-2 DANS L'ANALGÉSIE PAR LA MORPHINE

Nous avons montré un couplage fonctionnel entre le canal TREK-2 et les récepteurs μ OR dans un système d'expression hétérologue (Figure 27 A-B). Nous avons donc voulu évaluer quel était le rôle de TREK-2 dans l'effet analgésique de la morphine. Nous avons étudié l'analgésie induite par la morphine sur les neurones de DRG des souris TREK-2^{-/-}.

A. Effet de la morphine sur la thermosensibilité de fibres sauvages

Nous avons étudié l'effet de la morphine sur l'activité des fibres C cutanées de souris sauvages par la technique de nerf-peau. Nous avons d'abord mesuré l'activité basale de chaque fibre, soit leur activité spontanée avant l'application d'un stimulus. Puis le champ récepteur des fibres C, isolé à l'aide d'un anneau métallique placé sur la peau, a été perfusé pendant 10min avec une solution de morphine à 10 μ M. Nous avons ensuite appliqué une rampe chaude, de 30°C à 50°C, sur la peau pour évaluer l'effet de la morphine sur la thermosensibilité des fibres.

L'application de la morphine diminue sensiblement l'activité spontanée des fibres sauvages (Figure 49 A). De plus, la réponse des fibres à l'augmentation de la température est significativement inférieure après traitement à la morphine (Figure 49 B). La morphine diminue donc l'excitabilité des fibres C cutanées de souris sauvages.

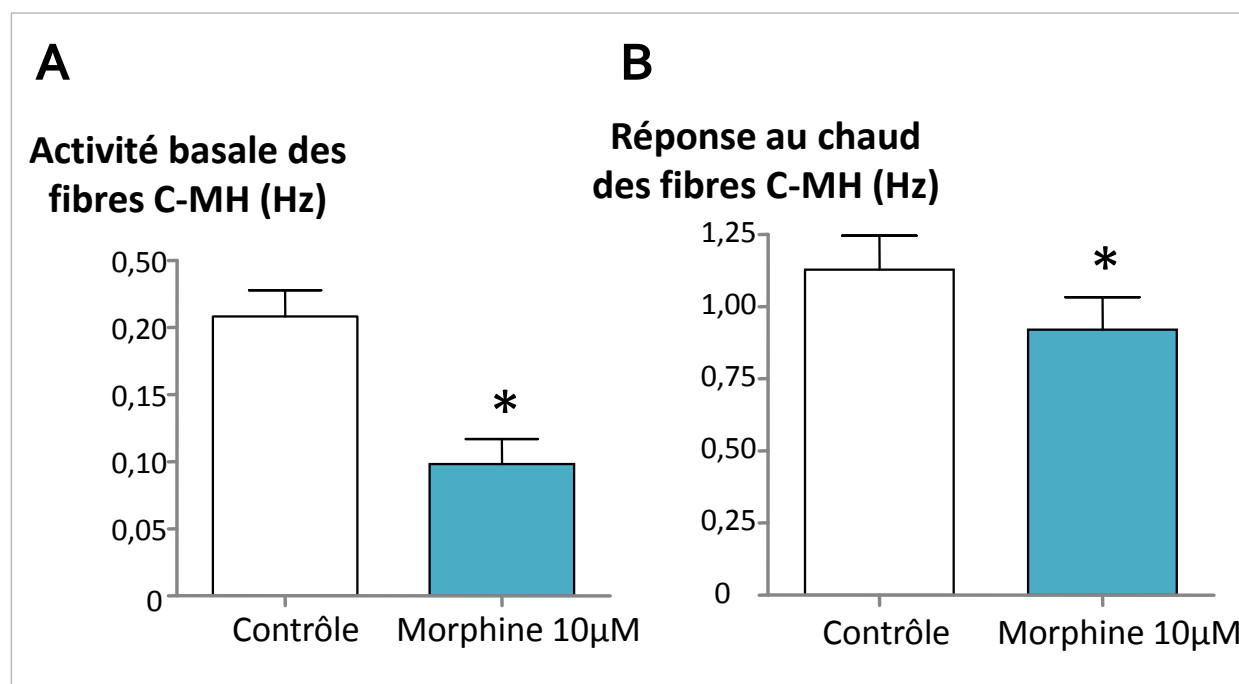


Figure 49 : Effet de la morphine sur l'activité des fibres C-MH sauvages. A. Effet de la morphine sur l'activité spontanée des fibres sauvages. Activité basale (nombre de PA.s^{-1}) des fibres C cutanées WT activées par le chaud avant (blanc, $n=24$ fibres, 9 expériences, 5 souris) et après un traitement de morphine $10\mu\text{M}$ pendant 10min (bleu, $n=11$ fibres, 9 expériences, 5 souris). B. Effet de la morphine sur la réponse au chaud des fibres sauvages. Réponse (nombre de PA.s^{-1}) des fibres C cutanées WT activées par le chaud pendant une rampe chaude de 30°C à 50°C en présence (bleu, $n=11$ fibres, 9 expériences, 5 souris) ou non (blanc, $n=24$ fibres, 9 expériences, 5 souris) de morphine $10\mu\text{M}$. Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm l'erreur-type. Les différences significatives entre les conditions contrôle et morphine $10\mu\text{M}$ sont marquées par : * ($p < 0,05$). Tests Mann Whitney (activité basale) et Wilcoxon (réponse au chaud).

B. Effet de la morphine sur la thermosensibilité de fibres TREK-2^{-/-}

Après avoir vérifié que la morphine a un effet sur l'activité des fibres sauvages, nous avons étudié l'impact de la délétion de TREK-2 sur l'effet induit par la morphine. L'activité spontanée des fibres TREK-2^{-/-} n'est pas modifiée par le traitement de morphine $10\mu\text{M}$ (Figure 50 A). Par contre, tout comme pour les fibres sauvages, la réponse au chaud des fibres TREK-2^{-/-} est significativement réduite en présence de morphine $10\mu\text{M}$ (Figure 50 B).

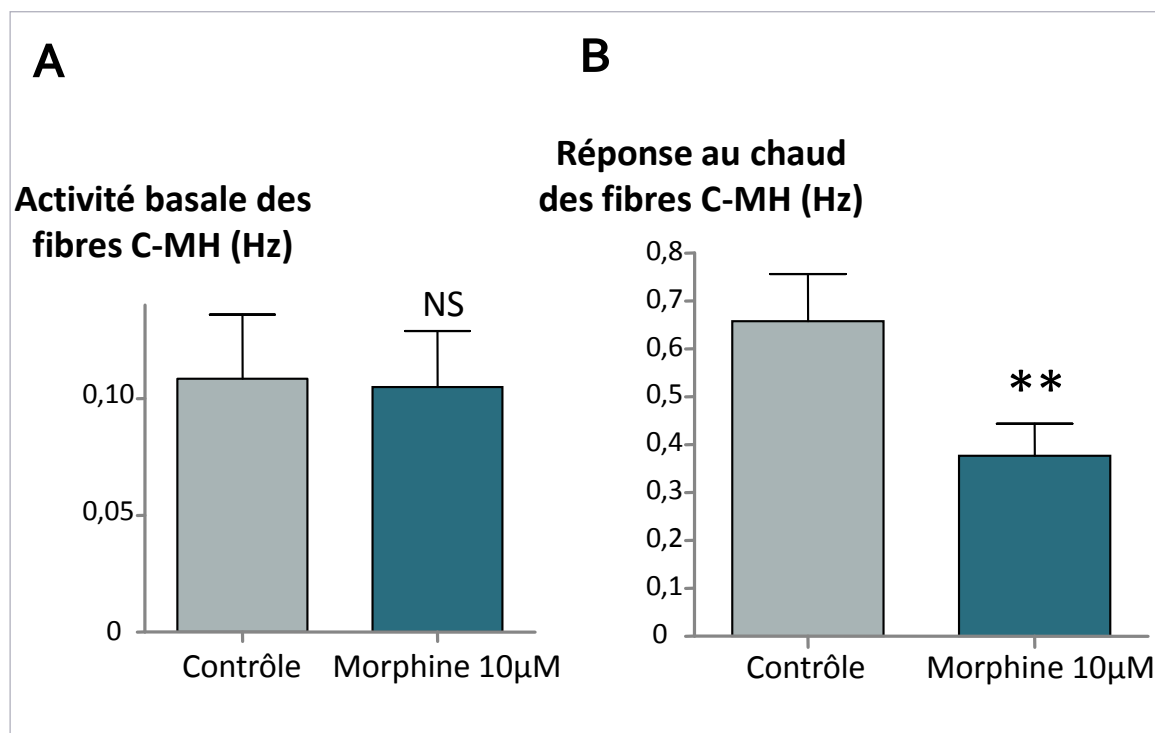


Figure 50 : Effet de la morphine sur l'activité des fibres C-MH TREK-2^{-/-}. A. Effet de la morphine sur l'activité spontanée des fibres TREK-2^{-/-}. Activité basale (nombre de PA.s⁻¹) des fibres C cutanées TREK-2^{-/-} activées par le chaud avant (gris, n=5 fibres, 3 expériences, 2 souris) et après un traitement de morphine 10µM pendant 10min (bleu-gris, n=8 fibre, 3 expériences, 2 souris). B. Effet de la morphine sur la réponse au chaud des fibres TREK-2^{-/-}. Réponse (nombre de PA.s⁻¹) des fibres C cutanées TREK-2^{-/-} activées par le chaud pendant une rampe chaude de 30°C à 50°C en présence (bleu-gris, n=8 fibre, 3 expériences, 2 souris) ou non de morphine 10µM (gris, n=5 fibres, 3 expériences, 2 souris). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes +/- l'erreur-type. NS: non significatif. Les différences significatives entre les conditions contrôle et morphine 10µM sont marquées par : ** (p<0,01). Tests Mann Whitney (activité basale) et Wilcoxon (réponse au chaud).

D'après ces résultats, le canal TREK-2 semble intervenir dans la diminution de l'excitabilité des fibres C induite par la morphine. Néanmoins, TREK-2 ne serait pas impliqué dans la baisse de la thermosensibilité des fibres.

Ces expériences sont encore préliminaires et il faudra les confirmer par la suite.

V DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution du canal TREK-2 dans la nociception. Pour cela, j'ai utilisé des souris invalidées pour le canal TREK-2 et pour l'ensemble des canaux TREK. J'ai étudié l'impact de la délétion du canal sur la thermosensibilité de neurones de DRG par imagerie calcique. Grâce à la technique de nerf peau, j'ai enregistré l'activité des fibres C cutanées des souris KO en réponse à des stimuli thermiques (chaud et froid). En parallèle, la thermosensibilité des souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} a été évaluée par une étude comportementale réalisée par nos collaborateurs du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur de Clermont-Ferrand.

Pour pouvoir enregistrer la réponse de fibres cutanées à un stimulus, il faut isoler le champ récepteur de chaque fibre sur la peau. Ce champ récepteur est identifié par stimulation mécanique de la peau, et les fibres enregistrées sont toutes mécanosensibles. J'ai donc mesuré pour chaque fibre le seuil de sensibilité mécanique et je n'ai observé aucune modification de la sensibilité mécanique des fibres C TREK-2^{-/-} par rapport aux fibres sauvages. Le canal TREK-2, malgré sa mécanosensibilité, ne semble pas impliqué dans la détermination des seuils de sensibilité mécaniques des fibres C nociceptives. Pourtant l'étude comportementale des souris TREK-2^{-/-} révèle que ce souris présentent une allodynie mécanique (Pereira et al., 2014). La dispersion des valeurs des seuils von Frey des fibres C est très grande et elle n'est pas centrée autour d'une moyenne forte. Il est donc difficile d'observer un changement de seuil de sensibilité. De plus, l'allodynie mécanique observée chez les souris implique probablement des fibres sensorielles à bas seuil, A β et A δ (Burgess and Perl, 1967; Djouhri and Lawson, 2004), que je n'ai pas étudiées durant ma thèse. Les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}, ont elles aussi une hypersensibilité mécanique mais qui n'est pas plus sévère que celle observée chez les souris TREK-2^{-/-}, ce qui exclut des mécanismes compensatoires entre les membres de la sous-famille TREK.

A. TREK-2 est impliqué dans la perception du chaud modéré

La sensibilité au chaud des neurones de DRG a été étudiée par imagerie calcique. La population de neurones de DRG comprend deux types de neurones sensoriels qui répondent à une augmentation de la température de 30°C à 48°C. Le type de neurones majoritaire chez les souris sauvages, qui représente 32% des neurones, est sensible à la fois au chaud et à la capsaïcine. Le second type de neurones, soit 18% de la population totale de neurones, est activée par le chaud mais pas par la capsaïcine. La délétion du canal TREK-2 augmente ces deux populations ce qui résulte en une fraction de neurones sensibles au chaud significativement plus importante que celle des souris sauvages. Il semble que le rôle des canaux TREK-2 est d'inhiber l'activation des nocicepteurs par le chaud probablement en contrebalançant l'activité d'autres

canaux thermosensibles excitateurs. Ceci est comparable au rôle proposé pour les canaux TREK-1 et TRAAK dans la perception thermique (Noël et al., 2009). Les neurones de DRG expriment à la fois des canaux dépolarisants thermosensibles, qui leur confèrent leur sensibilité thermique, et les canaux potassiques TREK-1, TREK-2 et/ou TRAAK qui ont un effet opposé. La fraction de neurones sensibles à la fois au chaud et à la capsaïcine expriment le canal TRPV1, qui semble être le seul canal connu activé par la capsaïcine. Le canal TREK-2 est donc capable de contrebalancer l'activité de TRPV1 lorsqu'il est activé par la température et sa délétion révèle une population de neurones normalement insensibles au chaud. Mais la délétion de TREK-2 révèle également une population de neurones insensible à la capsaïcine, qui pourrait exprimer alors un autre canal excitateur thermosensible. Parmi les canaux TRP, TRPV2, TRPV3 et TRPM3 sont activés par le chaud (Caterina et al., 1999; Moqrich et al., 2005) et pourraient être exprimés par cette population de neurones. Néanmoins, il pourrait s'agir d'autres canaux thermosensibles qui n'ont pas encore été identifiés (Abrahamsen et al., 2008). La délétion de l'ensemble des canaux TREK n'augmente pas plus la fraction de neurones activés par le chaud par rapport au simple KO ce qui suggère que TREK-1, TREK-2 et TRAAK inhibent la même population de neurones. Chez les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}, c'est la fraction de neurones sensibles à la capsaïcine qui augmente de façon significative. Il existe donc une population de neurones exprimant à la fois les canaux TRPV1 et les canaux TREK. Dans ces neurones, la présence d'un des canaux TREK suffit à neutraliser l'activation des canaux TRPV1 et ils sont inactifs entre 30°C et 48°C alors que le canal TRPV1 est activé dans des gammes de températures inférieures à 40°C, lorsque le potentiel de membrane est dépolarisé (Voets et al., 2004). Ces neurones pourraient correspondre à des fibres Aδ plutôt qu'à des fibres C (Mitchell et al., 2010). En culture, les neurones sont sélectionnés en fonction de la taille de leur corps cellulaire ce qui peut nous amener à prendre en compte des neurones Aδ de petit diamètre, qui représentent près de 20% des neurones de DRG qui sont activés à des températures plus hautes que les fibres C (Lewin and Moshourab, 2004; Treede et al., 1995).

L'analyse des fibres C cutanées montre que la délétion de TREK-2 augmente la fraction de fibres sensibles à une augmentation de la température de 30°C à 50°C. L'absence de TREK-2 conduit à l'activation d'une population de fibres C qui normalement ne s'activent pas avant 40°C. La fraction de fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} sensibles au chaud est comparable à celle des fibres TREK-2^{-/-}. Il ne semble pas y avoir d'effet cumulatif de la délétion des trois canaux pour la sensibilité au chaud des fibres C, ce qui suggère qu'il existe une population de fibres C sensibles au chaud qui exprime TREK-1, TREK-2 et TRAAK. Ces données sont donc tout à fait cohérentes avec les analyses des neurones de DRG par imagerie calcique. Nous avons observé que la fraction de fibres qui augmente chez les deux KO est à la fois sensible au chaud et au froid (C-MHC) alors que la fraction de fibres C-MH est comparable à celle des souris sauvages. La délétion des canaux TREK réduit donc la sélectivité thermique des fibres C.

On observe également que les fibres TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} ont un seuil d'activation à des températures nettement plus basses que les fibres sauvages. Elles s'activent autour de 36°C et 37°C respectivement alors que les fibres sauvages ont un seuil d'activation médian proche de 40°C. De plus, la fraction de fibres actives en dessous de 40°C est clairement plus importante chez les souris KO par rapport aux souris sauvages. Sur l'ensemble de la rampe chaude les fibres TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} répondent plus fortement que les fibres sauvages. Cette hyperexcitabilité est observable entre 30°C et 40°C par contre, au-delà de 40°C, seules les fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} montrent une réponse supérieure par rapport aux sauvages. Entre 40°C et 50°C, les fibres TREK-2^{-/-} ne sont pas plus actives que les fibres sauvages. Ces résultats indiquent que le canal TREK-2 régule la perception du chaud modéré des fibres C et que, au-delà de 40°C, le rôle de TREK-2 dans les fibres C est limité.

L'étude comportementale menée sur les souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} montrent que les souris KO ont une sensibilité thermique élevée entre 40°C et 46°C (**Figure 51 A-B**). Cette gamme de température est à la limite entre les températures de confort pour les souris (~40°C) et le chaud aversif (entre 45°C et 50°C) (**Pogorzala et al., 2013**). Le canal TREK-2 est donc nécessaire à la discrimination entre le chaud modéré et le chaud nocif. En l'absence du canal, les températures non douloureuses sont perçues comme nocives. Cela suggère qu'une modulation positive de TREK-2 pourrait avoir un effet analgésique sans altérer la perception du chaud nocif. À partir de 48°C, les souris TREK-2^{-/-} ne sont pas plus sensibles que les souris sauvages alors que les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} présentent toujours une hyperalgésie au chaud (**Figure 51 B-C**). Dans une étude précédente, notre équipe a montré que les souris TREK-1^{-/-} et TRAAK^{-/-} sont hypersensibles entre 46°C et 50°C (**Noël et al., 2009**). Il y aurait donc peu de chevauchement entre la gamme de températures impliquant TREK-1 et TRAAK avec la gamme de températures qui implique le canal TREK-2.

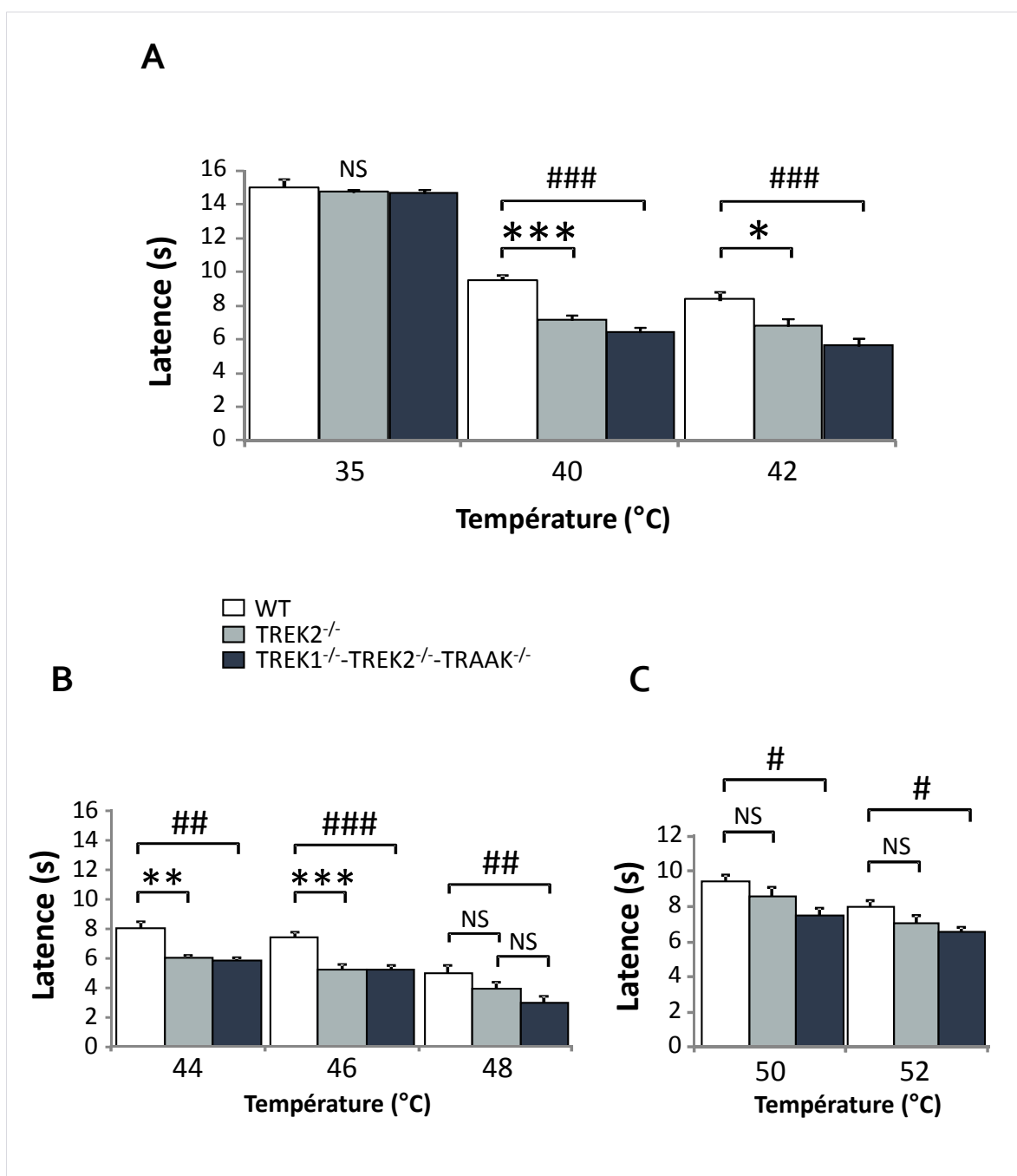


Figure 51: Altération de la perception au chaud des souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAACK^{-/-}. **A.** Test de l'immersion de la queue au chaud modéré. Latences de retrait de la queue à 35°C, 40°C et 42°C des souris WT (blanc), TREK-2^{-/-} (gris) et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAACK^{-/-} (bleu). **B.** Test de l'immersion de la queue au chaud nocif. Latence de retrait de la queue à 44°C, 46°C et 48°C. **C.** Comportement douloureux en réponse au chaud nocif. Les souris sont placées sur une plaque thermique à 50°C et 52°C. On mesure le temps passé sur la plaque avant l'apparition de signes de douleur (léchage ou secousse de la patte). Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm l'erreur-type. NS: non significatif. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-2^{-/-} sont marquées par : * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) et *** ($p < 0,001$). Les différences significatives entre les souris WT et TREK-1^{-/-}TREK-2^{-/-}TRAACK^{-/-} sont marquées par : # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$) et ### ($p < 0,001$). Test ANOVA à deux facteurs suivi d'un post-test de Bonferroni. D'après Pereira et al., 2014.

B. TREK-2 est impliqué dans la perception du froid modéré

La discrimination entre le froid modéré et le froid douloureux n'est pas encore bien comprise. Dans une étude précédente, notre équipe a montré que l'activité combinée des canaux TREK-1 et TRAAK contrôle la perception entre 20°C et 10°C alors que séparément, ces canaux n'influencent pas la perception du froid des souris (Noël et al., 2009).

Pendant ma thèse, j'ai pu montrer que la délétion des canaux TREK-2 augmente la fraction de neurones de DRG activés par le froid. Chez les souris sauvages, seule une faible population de neurones sont activés à la fois par le froid entre 30°C et 10°C et le menthol tandis qu'une population plus importante n'est activée que par le froid ce qui est en accord avec les données précédemment publiées (Babes et al., 2004, 2006). La délétion du canal TREK-2 augmente significativement la fraction de neurones activés par le froid et insensibles au menthol qui, de ce fait, n'expriment probablement pas le canal TRPM8. Le canal TREK-2 contrôle donc la perception au froid de neurones qui expriment un autre canal excitateur sensible au froid, par exemple le canal TRPA1 (Camino et al., 2010). La délétion de l'ensemble des canaux TREK augmente également la fraction de neurones sensibles au froid. Cette augmentation est similaire à celle observée chez les souris TREK-2^{-/-}. Il n'y a donc pas d'effet cumulatif de la délétion des canaux TREK.

L'absence du canal TREK-2 augmente la fraction de fibres C sensibles à la fois au froid et au chaud. Le seuil de sensibilité des fibres n'est pas modifié significativement par rapport à celui des fibres sauvages, même si il pourrait y avoir une tendance à une hypersensibilité des fibres puisque le seuil médian des fibres TREK-2^{-/-} se situe autour de 23°C alors que celui des fibres sauvages est d'environ 20°C. De plus, la fraction de fibres actives entre 30°C et 21°C est nettement supérieure chez les souris TREK-2^{-/-} par rapport aux souris sauvages. La réponse des fibres TREK-2^{-/-} est elle aussi augmentée entre 30°C et 21°C. La délétion de l'ensemble des canaux TREK augmente également la fraction de fibres C-MHC et les fibres TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} répondent plus fortement sur toute la rampe froide, soit entre 30°C et 10°C.

Les souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} présentent une hyperalgésie au froid entre 30°C et 20°C (Figure 52 A-B). Au-dessous de 20°C, les souris TREK-2^{-/-} ont le même comportement que les souris sauvages alors que les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} sont toujours hypersensibles (Figure 52 C-D). Ces résultats confortent nos observations en imagerie calcique et nerf-peau, indiquant que TREK-2 est impliqué dans la perception du froid non douloureux.

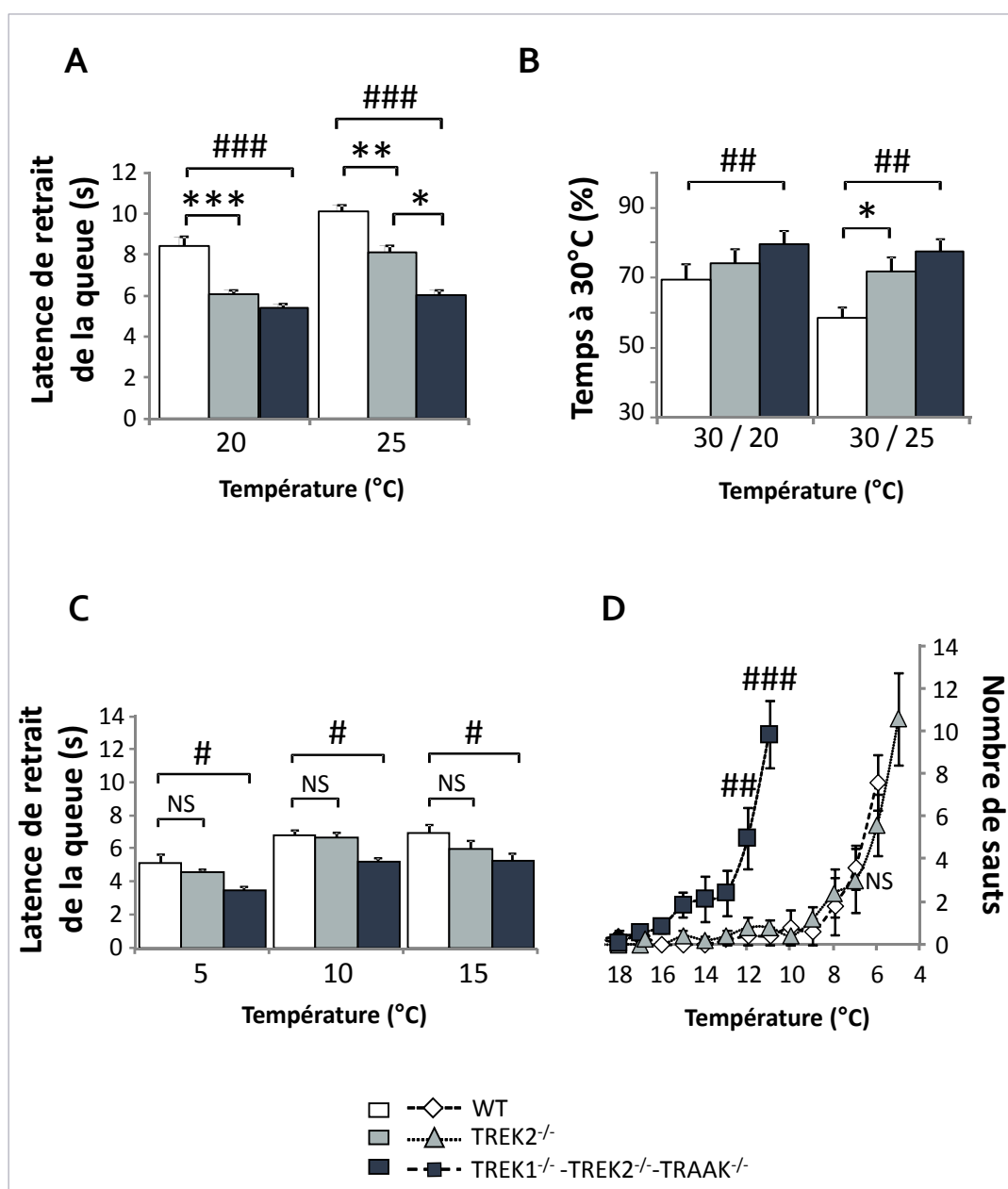


Figure 52 : Altération de la perception au froid des souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. **A.** Test de l'immersion de la queue au froid modéré. Latences de retrait de la queue à 20°C et 25°C des souris WT (blanc), TREK-2^{-/-} (gris) et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} (bleu). **B.** Test de préférence de place. Les souris sont placées sur des plaques thermiques adjacentes à 30°C et 25°C. Le temps passé sur chaque plaque est mesuré et le ratio de temps passé sur la plaque à 30°C versus 25°C est représenté ici. **C.** Test de l'immersion de la queue au froid nocif. Latences de retrait de la queue à 15°C, 10°C et 5°C. **D.** Comportement douloureux en réponse au froid nocif. Les souris sont placées sur une plaque thermique dont la température est abaissée progressivement de 18°C à 4°C. Le nombre de sauts, signe de douleur, est mesuré pour chaque degré. Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm l'erreur-type. NS: non significatif. Les différences significatives entre les souris WT et TREK-2^{-/-} sont marquées par : * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) et *** ($p < 0,001$). Les différences significatives entre les souris WT et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} sont marquées par : # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$) et ### ($p < 0,001$). Test ANOVA à deux facteurs suivi d'un post-test de Bonferroni. D'après Pereira et al., 2014.

L'oxaliplatine, un agent anti-cancéreux, provoque chez les patients traités une forte allodynie au froid (Attal et al., 2009; Wolf et al., 2008). Le traitement de souris avec cet agent diminue l'expression du canal TREK-2 dans les neurones de DRG (Pereira et al., 2014). TREK-2 participerait donc aussi à l'hyperalgésie au froid induite par l'oxaliplatine. Ce phénomène est complexe, et il est fort probable que d'autres canaux y participent et en particulier des canaux potassiques impliqués dans la douleur chronique (Tsantoulas and McMahon, 2014).

Dans cette étude nous avons donc pu montrer que le canal TREK-2 est impliqué dans la perception thermique dans des gammes de températures non nocives. Les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK ont des rôles complémentaires avec très peu de redondance fonctionnelle dans la thermo sensation. TREK-2 contrôle la thermo sensation entre 40°C et 46°C pour le chaud et entre 20°C et 25°C pour le froid tandis que TREK-1 et TRAAK, individuellement ou en combinaison, contrôlent la perception de températures nocives, au-dessus de 46°C et au-dessous de 17°C. Ces observations sont similaires aux résultats montrant les contributions respectives de différents canaux excitateurs dans la perception thermique. Les études des souris invalidées pour les canaux TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4 montrent que la délétion de l'un de ces canaux n'abolit pas complètement la sensation au chaud (Nilius et al., 2007; Pogorzala et al., 2013; Vay et al., 2012). Cela suggère qu'il existe une certaine redondance fonctionnelle entre ces différents canaux. Mais d'autres canaux ont également été impliqués dans la perception du chaud, comme TRPM3 (Vriens et al., 2011). Ce même phénomène a été rapporté pour les canaux TRPM8, TRPA1 et TRPC5 dans la perception du froid (Foulkes and Wood, 2007; McCoy et al., 2011; Zimmermann et al., 2011).

Il avait été proposé par notre équipe que les canaux TREK-1 et TRAAK sont des modulateurs de la thermosensibilité en s'opposant à la dépolarisation des nocicepteurs par des canaux excitateurs de façon température-dépendante (Noël et al., 2009). Mes travaux de thèse démontrent qu'il en est probablement de même pour le canal TREK-2. Notre hypothèse est que les canaux TREK produisent un contrôle température-dépendant du potentiel de membrane dans les neurones sensoriels et que les variations du potentiel induites vont contrôler la sensibilité thermique des canaux TRP. On sait que la dépolarisation sensibilise les canaux TRP au chaud, pour TRPV1, et au froid, pour TRPM8. L'activité du canal TRPV1 est fortement augmentée à 42°C par la dépolarisation de la membrane, et il en est de même à 15°C pour le canal TRPM8 (Voets et al., 2004). Nous avons d'ailleurs montré que la délétion du canal TREK-2 dépolarise sensiblement les neurones de DRG.

Nous montrons également que le canal TREK-2 contrôle la perception thermique dans des gammes de température modérées, et donc différentes de celles contrôlées par TREK-1 et TRAAK. Cela s'expliquerait par le fait que TREK-2 est exprimé dans une sous population de neurones dédiés à la perception de températures non douloureuses.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires afin d'évaluer le rôle du canal TREK-2 dans l'analgésie thermique induite par la morphine. Nous avons déjà montré qu'il existe un couplage fonctionnel entre le canal TREK-2 et les récepteurs μ OR, ce qui, en plus des fortes similitudes de TREK-2 avec le canal TREK-1, suggère l'implication du canal dans l'effet de la morphine.

La morphine diminue significativement l'excitabilité des fibres C de souris sauvages, agissant à la fois sur l'activité spontanée des fibres ainsi que sur leur réponse à une augmentation de température. Chez les souris TREK-2^{-/-}, la morphine n'a aucun effet sur l'activité spontanée des fibres C cutanées. Par contre on observe, comme chez les souris sauvages, une diminution de la réponse au chaud des fibres après traitement à la morphine.

Ces résultats suggèrent que le canal TREK-2 pourrait être impliqué dans la diminution de l'activité basale spontanée des fibres induite par la morphine mais qu'il n'interviendrait pas dans l'analgésie thermique périphérique de la morphine.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon projet de thèse s'est directement inscrit dans l'un des axes de recherche du laboratoire qui porte sur l'étude du rôle des canaux TREK dans la physiologie de la nociception. Les résultats publiés par l'équipe ont montré que les canaux TREK-1 et TRAAK sont des senseurs moléculaires essentiels dans la perception polymodale de la douleur et qu'ils interviennent dans l'excitabilité des nocicepteurs, modulant ainsi le message douloureux. L'objectif de ma thèse a été d'évaluer la contribution des canaux TREK dans la douleur et dans l'analgésie induite par la morphine grâce à l'utilisation de souris invalidées pour ces canaux.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons voulu déterminer si les canaux TREK étaient impliqués dans l'activité antalgique de la morphine, l'un des analgésiques les plus couramment utilisés. Nous avons mis en évidence qu'il existe, dans des systèmes d'expression hétérologue, une relation fonctionnelle entre le canal TREK-1 et les récepteurs opioïdes μ OR et δ OR qui sont les principaux récepteurs aux opioïdes impliqués dans l'analgésie. Nous montrons également que le canal TREK-2, mais pas le canal TRAAK, est activé par la morphine via un couplage avec les récepteurs μ OR. Dans ce modèle, TREK-1 et TREK-2 peuvent être modulés par la morphine. Nous proposons que cette régulation passe par la voie de signalisation de la protéine G_i , couplée aux récepteurs opioïdes, qui lève l'inhibition tonique exercée par la PKA sur les canaux TREK-1 et TREK-2.

Nous avons étudié si cette relation fonctionnelle existait dans les neurones de moelle épinière et les neurones sensoriels de DRG de souris. Par une approche d'imagerie calcique, nous avons observé que l'absence du canal TREK-1 diminue l'effet de la morphine sur l'excitabilité des neurones de moelle en culture (i) en réduisant le nombre de neurones sensibles à la morphine et (ii) en altérant son effet inhibiteur sur l'activité neuronale. D'autre part, nous montrons que la délétion de TREK-1 dans les neurones de DRG abolit l'effet analgésique de la morphine sur leur thermosensibilité. Le canal TREK-1 est donc impliqué dans les effets centraux et périphériques de la morphine.

L'étude comportementale de souris invalidées pour le canal TREK-1, réalisée par nos collaborateurs du Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur de Clermont-Ferrand, confirme que le canal TREK-1 intervient dans l'analgésie thermique induite par la morphine via l'activation du récepteur μ OR. Elle démontre également que TREK-1 n'est nullement impliqué dans les effets secondaires principaux de la morphine que sont la dépendance, la dépression respiratoire et la constipation.

Pour la première fois, nous montrons que le canal TREK-1 est un médiateur de l'analgésie induite par la morphine agissant en aval des récepteurs aux opioïdes et qui n'intervient pas dans ses effets secondaires délétères. TREK-1 est donc une cible de choix pour le développement de nouveaux antalgiques puissants dépourvu d'effets secondaires.

Dans la seconde partie de ces travaux, nous avons évalué l'impact du canal TREK-2 dans la perception de la douleur. Nous avons utilisé une approche intégrée, associant des techniques d'électrophysiologie *in vitro* et *ex vivo* et d'imagerie, afin d'étudier la thermosensibilité de souris invalidées pour le canal TREK-2 ou pour l'ensemble des canaux TREK. Nous montrons d'abord que la délétion du canal TREK-2 dépolarise le potentiel de membrane des neurones sensoriels de DRG. Le potentiel de membrane de ces neurones serait alors corrélé aux niveaux d'expression de TREK-2. Le canal est donc un puissant modulateur de l'excitabilité des neurones sensoriels de DRG.

La délétion de TREK-2 augmente le nombre de neurones de DRG activés par des variations de températures (chaud ou au froid). De plus, elle accroît la fraction de fibres C cutanées thermosensibles, plus particulièrement la population de fibres sensibles à la fois au chaud et au froid. L'absence de TREK-2 diminue donc la spécificité thermique des fibres afférentes primaires. Les fibres C de souris invalidées pour le canal TREK-2 ont un seuil de sensibilité thermique abaissé et répondent plus fortement au froid et au chaud par rapport aux fibres de souris sauvages. De façon intéressante, cette hypersensibilité des fibres C est visible dans des gammes de températures bien précises, entre 30°C et 40°C pour le chaud et entre 30°C et 21°C pour le froid. Le canal TREK-2 est donc impliqué dans la perception thermique, au chaud et au froid, dans des gammes de températures modérées. Par contre nous n'observons pas d'effet de la délétion de TREK-2 sur la mécanosensibilité des fibres C, suggérant que TREK-2 ne serait pas impliqué dans la perception mécanique. L'étude comportementale menée par nos collaborateurs montre que les souris TREK-2^{-/-} présentent une altération de la perception du chaud et du froid modérés, mais que leur réponse à des stimuli thermiques plus intenses (<20°C ou >46°C) est comparable à celle des souris sauvages, confirmant ainsi nos résultats *in vivo*.

Par les mêmes approches, nous avons observé l'impact de la délétion de l'ensemble des canaux TREK sur la thermosensibilité des neurones sensoriels de DRG et des fibres C cutanées. Les populations de neurones de DRG et de fibres C thermosensibles sont augmentées de façon comparable chez les souris TREK-2^{-/-} et TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}. Les fibres C présentent une réponse exacerbée au froid et au chaud, y compris pour des températures nocives (soit au-delà de 40°C ou inférieure à 20°C). Les souris TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-} sont hypersensibles au chaud et au froid, modérés et nocifs. Les canaux TREK-1 et TRAAK ont été impliqués dans la perception du chaud, au-delà de 46°C. La simple délétion de TREK-1 ou de TRAAK n'affecte pas la détection

du froid chez l'animal. Mais TREK-1 et TRAAK combinés interviennent dans la perception de températures froides, inférieures à 17°C.

Nous montrons donc que le canal TREK-2 est l'unique membre de sa sous-famille à pouvoir moduler seul la réponse au froid des neurones et des fibres sensoriels périphériques. Mais nous établissons également que l'activité de TREK-2 est complémentaire de celle déjà rapportée pour les canaux TREK-1 et TRAAK, car contrairement à TREK-1 et TRAAK, TREK-2 intervient dans la perception de températures non nocives. Les canaux TREK contribuent donc à la perception thermique dans des gammes de températures différentes.

L'ensemble de ces travaux de thèse montrent que les canaux potassiques de fond TREK jouent un rôle essentiel dans la perception et la modulation du message douloureux et pourraient être des cibles intéressantes pour le traitement de la douleur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I ANIMAUX

Les expériences sont réalisées sur des souris mâles de la souche C57Black/6J (WT) et des souris invalidées pour le canal TREK-1 (TREK-1^{-/-}), Le canal TREK-2 (TREK-2^{-/-}), ou pour l'ensemble des canaux TREK (TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}). Les souris WT proviennent des laboratoires Charles River et ne sont utilisés qu'après une semaine d'habituation aux conditions de l'animalerie. Les souris TREK-1^{-/-} et TREK-2^{-/-} sont développées à l'institut (Guyon et al., 2009; Heurteaux et al., 2004).

L'invalidation du gène *Trek1* a été obtenue par excision de l'exon 3 qui correspond au segment TM1. Les acides aminés 47 à 67 ont été délétés ce qui comprend la cystéine responsable de la dimérisation du canal (C52), nécessaire à la création d'un canal fonctionnel (Heurteaux et al., 2004). Pour le gène *Trek2*, l'exon 2 a été dupliqué, formant un nouveau codon stop, ce qui génère une protéine tronquée non fonctionnelle (Guyon et al., 2009). Le gène *Traak* a été invalidé par le remplacement d'une partie de l'exon 2 (de 100pb), qui code pour la grande partie du domaine TM1 du canal, par une cassette IRES-geo. La présence de trois codons STOP en amont du site d'insertion de la cassette induit l'interruption de la traduction de l'ARNm de la protéine native. Cela génère une forme tronquée de la protéine ne contenant que les 18 premier acides aminés, non fonctionnelle (Heurteaux et al., 2004).

Les souris triple KO ont été obtenues par croisement de souris double KO TREK1^{-/-}-TRAAK^{-/-} (Heurteaux et al., 2004; Noël et al., 2009) avec des souris simple KO TREK2^{-/-}.

Les souris utilisées dans nos expériences ont 10 à 12 semaines. Elles sont acclimatées une semaine ou plus avant d'être utilisées. Elles sont élevées en cage de six avec nourriture et eau ad libitum. Toutes les procédures impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité Institutionnel d'éthique pour Animal de Laboratoire (CIEPAL) – Azur (C2EA-28) et les expérimentations ont été réalisées en accord avec les règles d'éthiques fournies par la Communauté Européenne pour le soin et l'utilisation d'animaux (86/609/CEE).

II CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES SENSORIELS DE DRG

Les neurones des ganglions sensoriels spinaux lombaires en culture primaire sont préparés à partir de souris WT C57Bl/6J, ou KO (TREK-1^{-/-}, TREK-2^{-/-} ou TREK-1^{-/-}-TREK-2^{-/-}-TRAAK^{-/-}), mâles, de 10 à 12 semaines. Les ganglions spinaux des souris de chaque génotype sont disséqués en parallèle. Les neurones en culture de chaque génotype sont testés alternativement dans les mêmes conditions.

La colonne vertébrale est dégagée ventralement et les vertèbres sont coupées pour libérer la moelle épinière. Les 12 ganglions lombaires sont récupérés et placés dans de l'HBSS(-) (Hank's Salt Solution, sans calcium ni magnésium, Gibco®). Les ganglions sont placés dans de la collagénase (Biochrom®, CLS II) à 0,2% pendant 1h45 à 37°C. Ils sont rincés à l'HBSS(-) puis mis dans la trypsine (Seromed®) à 0,25mg/mL pendant 15min à température ambiante. Ils sont ensuite dissociés mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée 5min à 200g. Les cellules culotées sont reprises dans du milieu de culture complet, composé de HAM F-12 (Lonza®), 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (HyClone®), 1% d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, BioWhittaker®) et 50ng/mL de facteur de croissance neuronal NGF (Sigma®) pour maintenir la différenciation des neurones. On dépose 20µL de suspension cellulaire en goutte centrale, soit l'équivalent de 2 à 3 ganglions, sur des lamelles de verre type I de 22mm de diamètre, préalablement recouvertes de Poly-L-Lysine 0,30mg/mL (Sigma®). Les cellules sont mises en culture dans 2mL de milieu complet pendant 2 à 7 jours à 37°C, en atmosphère 5% CO₂.

III CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES DE MOELLE ÉPINIÈRE

Les neurones de moelle épinière en culture primaire sont préparés à partir de nouveau-nés souris WT C57Bl/6J, ou TREK-1^{-/-}, à J0 ou J1. Les neurones de chaque génotype sont disséqués en parallèle et, une fois en culture, sont testés alternativement dans les mêmes conditions.

La colonne vertébrale est dégagée dorsalement. Après avoir délaminé, la moelle épinière est prélevée et placée dans du milieu Neurobasal A stérile (Life technologies®) et coupée en tronçons. Les tronçons de moelle sont rincés deux fois à l'HBSS(-) (Gibco®) et une fois au DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Life Technologies®). Ils sont ensuite incubés à température ambiante ~5min dans un milieu de digestion composé de DPBS, de Trypsine 2,5% (Seromed®) et de DNase I 11320U/mL. Après un rinçage au Neurobasal, les tronçons sont placés dans une solution de DNase I (11320U/mL) dans du Neurobasal A et dissociés mécaniquement à l'aide d'une propipette

stérile. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée 5min à 200g. Les cellules culotées sont resuspensées dans du milieu de culture complet, composé de Neurobasal A, 1% de Glutamax, 1% de SVF décomplémenté, d'antibiotiques (Gentamycine, BioWhittaker©) et 2% de B27 (Gibco©). On dépose 20µL de suspension cellulaire en goutte centrale dans des boîtes de pétri 35mm sur des lamelles de verre type I de 22mm de diamètre, préalablement recouvertes de Poly-L-Lysine 0,30mg/mL (Sigma©). Les cellules sont mises en culture dans 2mL de milieu complet pendant 15 à 20 jours à 37°C, en atmosphère 5% CO₂.

IV IMAGERIE CALCIQUE

La sonde calcique utilisée est le FURA-2 (Invitrogen©) (Grynkiewicz et al., 1985). Le FURA-2 est une sonde ratiométrique. Lorsque cette sonde fixe le calcium, son spectre d'excitation est déplacé, c'est-à-dire que le spectre d'excitation de la sonde libre est différent de celui de la sonde liée au calcium. Le pic d'excitation de la sonde libre est à 380nm, le pic de la sonde fixée au calcium est de 340nm. Pendant l'expérience, on excite la sonde alternativement à 340 et 380nm et on capture l'émission de fluorescence à 515nm après chaque excitation. L'évolution du ratio Fluorescence₃₄₀/Fluorescence₃₈₀ détermine les variations de la concentration de calcium dans la cellule. L'intérêt des sondes ratiométriques est que l'on s'affranchit de la concentration de la sonde dans les différentes cellules et donc d'une différence de charge entre les cellules.

Les neurones sont utilisés à partir de deux jours après leur mise en culture. Le FURA-2 est chargé dans les cellules à partir de FURA-2-AM (AcétoxyMéthylester). Le FURA-2-AM est une sonde perméante dont les fonctions carboxyliques du FURA-2 sont neutralisées par les groupements AM. Le FURA-2-AM est hydrolysé par les estérases cytosoliques et le FURA-2 se retrouve piégé dans la cellule. Les cellules sont incubées pendant 45min à l'obscurité dans du milieu extracellulaire à température ambiante avec de la BSA (Bovine Albumin Serum) à 1% et 10µM de FURA-2-AM. Le milieu extracellulaire est composé de : NaCl 145mM, KCl 5mM, HEPES 10mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM et NaHCO₃ 1mM, avec un pH ajusté à 7,4. Ce milieu est perfusé en continu sur les cellules pendant l'expérience avec du milieu extracellulaire à température fixée grâce à un contrôleur de température CL-100 (Warner Instrument©). La température du bain est contrôlée en permanence avec une sonde thermique proche du champ d'observation.

La fluorescence est mesurée toutes les 2 à 5sec avec une caméra EM-CCD (Cascade II 512, Photometrics©) sur un microscope Zeiss Observer Z.1 avec un objectif plan apochromat 20x et le logiciel d'acquisition et d'analyse Metafluor (Molecular Devices©). Pour l'analyse, des régions d'intérêt (RI) sont définies manuellement autour des neurones. La fluorescence est exprimée pour chaque RI par le ratio F_{340}/F_{380} . Les valeurs de ratios sont normalisées par la valeur moyenne des 25 premiers ratios, en début d'expérience. Les cellules qui présentent une variation du ratio de

fluorescence supérieure à trois fois l'écart-type à la moyenne des 25 premiers ratios sont considérées comme positives pour un stimulus.

L'excitabilité des neurones de moelle en culture est évaluée grâce à leur réponse à une solution de glutamate 10 μ M, directement perfusée sur les cellules pendant ~1min (jusqu'à stabilisation de la réponse). Puis une solution de morphine chlorhydrate 10 μ M (Cooper®) est perfusée pendant 5min. Pour chaque cellule activée par le glutamate, nous comparons les ratios de fluorescence avant et après application de morphine. L'effet inhibiteur de la morphine est calculé en faisant le ratio de la différence de fluorescence avant et après traitement par la valeur moyenne des dernières mesures en condition glutamate. En fin d'expérience, nous vérifions que les cellules enregistrées sont bien des neurones en appliquant une solution riche en potassium (NaCl 60mM, KCl 90mM, HEPES 10mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM et NaHCO₃ 1mM).

Les neurones sensoriels de DRG sont sensoriels, identifiés par un corps cellulaire rond et nous ne choisissons que des neurones de petit diamètre, correspondant aux nocicepteurs (diamètre <20 μ m). La sensibilité des neurones sensoriels de DRG à la température est testée en diminuant la température de 30 à 10°C en 90s ou en l'augmentant de 30 à 48°C en 45s. Les agonistes de canaux TRP, Menthol 500 μ M et Capsaïcine 10 μ M (Sigma®), sont appliqués par perfusion locale pendant 2min puis rincés pendant plus de 3min. Les cellules prétraitées à la morphine 10 μ M sont perfusés pendant 10min avec la solution de morphine avant de réaliser l'expérience.

En fin d'expérience, la charge de FURA-2 cellulaire est calibrée en mesurant les ratios maximal et minimal par un protocole de ionomycine 1mg/mL (Sigma-Aldrich®) puis d'EGTA 0,1M. La ionomycine, un ionophore à calcium, perméabilise la membrane et sature la cellule en calcium, tandis que l'EGTA chélate le calcium et le fait sortir de la cellule.

V ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES

A. Enregistrements de patch-clamp

Les cellules COS sont ensemencées à une densité de 20 000 cellules par boîte de petri de diamètre 35mm et incubées à 37°C dans un milieu composé de DMEM, 10% de SFV et 1% d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine, BioWhittaker®). Les cellules sont transfectées par le réactif JetPEI® (Polypus Transfection®) un jour après l'ensemencement selon le protocole du fournisseur. Afin de faire coexprimer les canaux TREK et les récepteurs opioïdes dans les cellules, elles sont incubées avec un mix de plasmides contenant l'ADN de récepteurs opioïdes (muOR-

EGFP ou deltaOR-EGFP) et des plasmides contenant l'ADN des différents canaux TREK (pIRES2-TREK-1-EGFP, pIRES-TREK-2-EGFP ou pIRES-TRAAK-EGFP) et du JetPEI® (soit 2µL/µg d'ADN).

Les cellules transfectées, identifiées par leur fluorescence verte, sont utilisées 2 à 4 jours après transfection. Nous avons utilisé la technique de patch-clamp, en configuration voltage imposé en cellule entière, pour mesurer les courants membranaires des cellules transfectées. Les amplitudes de courant sont mesurées à 0mV.

Les enregistrements sont réalisés à température ambiante avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments©) avec un filtre passe-bas à 3kHz (Krhon-Hite©). Les données sont digitalisées à 10kHz par une interface A/D Digidata 1440 (Axon Instruments©) et enregistrées avec le programme pClamp10 (Axon Instruments©). Les pipettes de patch (de 3 à 5 MΩ) contiennent une solution composée de KCl 135mM, NaCl 5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM, EGTA 5mM et HEPES 10mM à un pH ajusté à 7,4. Les cellules baignent dans une solution de NaCl 145mM, KCl 5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM et HEPES 10mM (milieu extracellulaire, pH 7,4). Les composés testés sur les cellules (AA et morphine chlorhydrate) sont préparés dans le milieu extracellulaire et sont appliquées directement sur les cellules par un système de micro perfusion contrôlé par des valves microsolenoides (SIRAI©) qui permet un changement rapide des solutions perfusées.

B. Mesure du potentiel de repos des neurones de DRG en culture

Les neurones de DRG sont utilisés 2 à 4 jours après leur mise en culture. Nous avons utilisé la technique de patch-clamp, en configuration courant imposé en cellule entière, pour mesurer les potentiels de repos des neurones.

Les enregistrements sont réalisés sur des neurones identifiés par leur corps cellulaire rond. Seuls les neurones présentant un potentiel de repos stable pendant au moins 2min ont été analysés.

Les enregistrements sont réalisés à température ambiante avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments©) avec un filtre passe-bas à 3kHz (Krhon-Hite©). Les données sont digitalisées à 10kHz par une interface A/D Digidata 1440 (Axon Instruments©) et enregistrées avec le programme pClamp10 (Axon Instruments©). Les pipettes de patch (de 3 à 5 MΩ) contiennent une solution composée de KCl 135mM, ATP-Na 2,5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM, EGTA 5mM et HEPES 10mM à un pH ajusté à 7,4. Les cellules baignent dans une solution de NaCl 145mM, KCl 5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM et HEPES 10mM (milieu extracellulaire, pH 7,4). Le milieu extracellulaire est perfusé directement sur les cellules par un système de micro perfusion contrôlé par des valves microsolenoides (SIRAI©).

VI ENREGISTREMENTS DE FIBRES C UNITAIRES, TECHNIQUE DE NERF-PEAU

La peau de la patte arrière droite d'une souris est disséquée avec le nerf saphène associé (**Figure 53 A**). La préparation, nerf et peau, est maintenue dans un liquide interstitiel synthétique (SIF) composé de : NaCl 120mM, KCl 3,5mM, CaCl₂ 2mM, MgSO₄ 0,7mM, NaH₂PO₄ 1,7mM, NaHCO₃ 5mM, gluconate de sodium 9,5mM, sucrose 7,5mM, HEPES 10mM et glucose 5,5mM, avec un pH ajusté à 7,4. La peau est fixée dans une chambre d'organe et l'extrémité libre du nerf saphène est étirée dans une chambre d'enregistrement remplie d'huile minérale (**Figure 53 B**). La peau est perfusée en permanence avec du SIF à 30°C et oxygéné (O₂ 95%, CO₂ 5%). Les fibres nerveuses de l'extrémité du nerf sont individualisées et l'une d'entre elles déposée sur l'électrode d'enregistrement extracellulaire en or. Le champ réceptif cutané de cette fibre est localisé par stimulation mécanique avec une tige de verre. Puis le champ récepteur est stimulé par des filaments de von Frey, dont la force est calibrée, qui servent à déterminer le seuil de sensibilité mécanique de la fibre. Les potentiels d'action sont amplifiés 10 000 fois avec un amplificateur différentiel isolé DAM 80 (World Precision Instruments®), digitalisés à 10kHz avec une interface A/D Digidata 1320 (Axon Instruments®) et enregistrés avec le programme pClamp 10 (Axon Laboratory®). La vitesse de conduction des fibres est mesurée par stimulation électrique avec un stimulateur isolé à courant constant A 385 (World Precision Instruments®). Les fibres dont la vitesse de conduction est inférieure à 1,5m.s⁻¹ sont identifiées comme des fibres C non myélinisées. Le champ réceptif de la fibre enregistrée est isolé avec un anneau métallique d'une contenance d'environ 400µL déposé sur la peau. Le volume intérieur de l'anneau est perfusé avec du SIF par un système thermorégulateur CL-100 (Warner Instruments®). La température sur le champ réceptif est augmentée de 30 à 50°C en 50s et diminuée de 30 à 10°C en 90s. La réponse d'une fibre aux changements de température se mesure par la génération d'un ou plusieurs potentiels d'action pendant la rampe. Le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design®) est utilisé pour la détection de seuil, la cinétique et l'analyse de fréquence des potentiels d'action. La solution de morphine chlorhydrate 10µM est directement perfusée sur le champ récepteur dans l'anneau métallique pendant 10min avant l'application d'une rampe chaude.

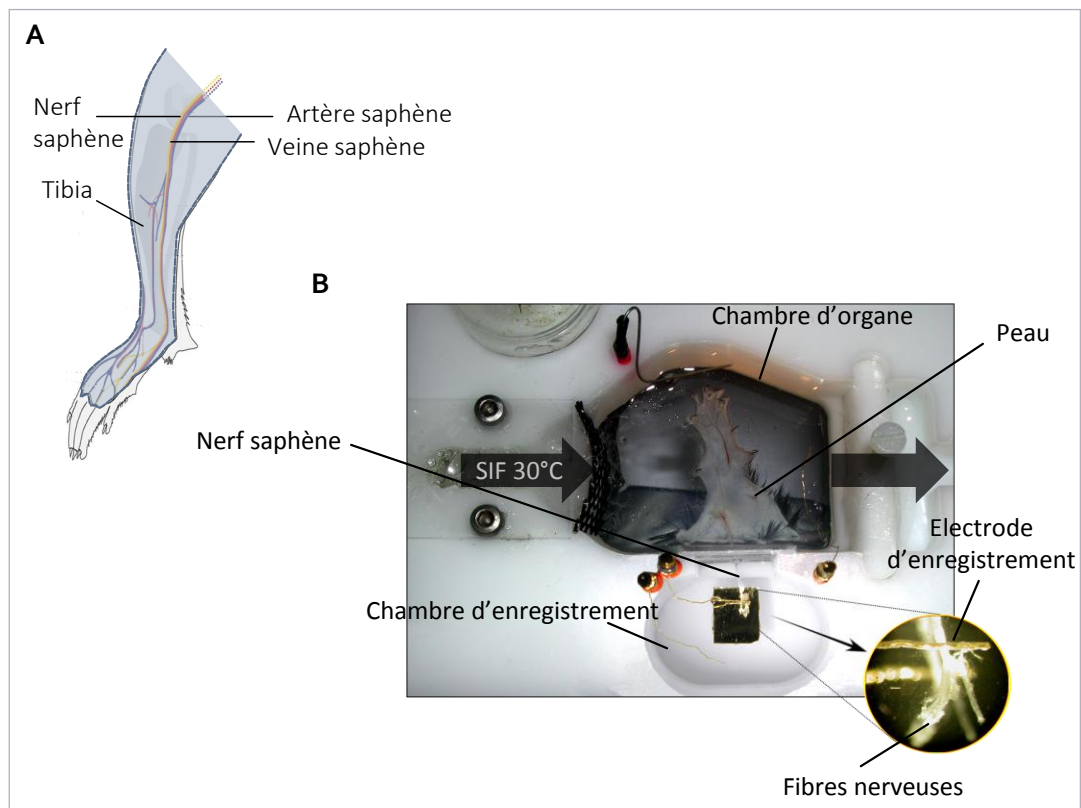


Figure 53 : Préparation de nerf-peau. A. Représentation schématique d'une patte arrière droite de souris. On distingue le nerf saphène, longé par l'artère et la veine saphène. Le trait en pointillés représente la portion de peau qui est récupérée lors de la dissection. B. Vue du dessus de la préparation nerf-peau. La peau est placée dans la chambre d'organe, perfusée de liquide interstitiel synthétique (flèche) à 30°C. L'extrémité du nerf est placée dans la chambre d'enregistrement. Les fibres nerveuses dissociées sont déposées sur l'électrode d'enregistrement (insert).

VII STATISTIQUES

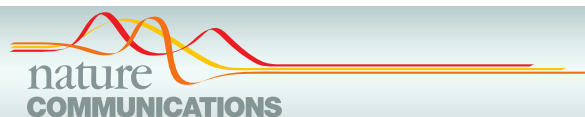
En dépendant du protocole expérimental, les données ont été analysées par les tests :

- Test Mann Whitney : test non paramétrique de comparaison de moyennes
- Test apparié de Wilcoxon : test non paramétrique de comparaison de deux moyennes de données appariées
- Test Chi2 : test de comparaison de deux pourcentages.

Chaque test indiqué est spécifié dans la légende de chaque figure. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software®). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur type.

ANNEXES

ARTICLE 1



ARTICLE

Received 20 Sep 2013 | Accepted 15 Nov 2013 | Published 17 Dec 2013

DOI: 10.1038/ncomms3941

Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects

Maïly Devilliers^{1,2,*}, Jérôme Busserolles^{1,2,*}, Stéphane Lolignier^{1,2}, Emmanuel Deval^{3,4,5}, Vanessa Pereira^{1,2}, Abdelkrim Alloui^{1,2}, Marine Christin^{3,4,5}, Bruno Mazet⁶, Patrick Delmas⁶, Jacques Noel^{3,4,5}, Michel Lazdunski^{3,4} & Alain Eschalier^{1,2,7}

Morphine is the gold-standard pain reliever for severe acute or chronic pain but it also produces adverse side effects that can alter the quality of life of patients and, in some rare cases, jeopardize the vital prognosis. Morphine elicits both therapeutic and adverse effects primarily through the same μ opioid receptor subtype, which makes it difficult to separate the two types of effects. Here we show that beneficial and deleterious effects of morphine are mediated through different signalling pathways downstream from μ opioid receptor. We demonstrate that the TREK-1 K^+ channel is a crucial contributor of morphine-induced analgesia in mice, while it is not involved in morphine-induced constipation, respiratory depression and dependence—three main adverse effects of opioid analgesic therapy. These observations suggest that direct activation of the TREK-1 K^+ channel, acting downstream from the μ opioid receptor, might have strong analgesic effects without opioid-like adverse effects.

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, 63000 Clermont-Ferrand, France. ²Inserm, U 1107, Neuro-Dol, 63000 Clermont-Ferrand, France. ³Université de Nice Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. ⁴CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 660 Route des Lucioles Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. ⁵LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, 06560 Valbonne, France. ⁶Aix Marseille Université, CNRS, CRN2M UMR 7286, 13344 cedex 15, Marseille, France. ⁷CHU Clermont-Ferrand, Service de pharmacologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.L. (email: lazdunski@ipmc.cnrs.fr) or to A.E. (email: alain.eschalier@udamail.fr).

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms3941

Most opioid analgesic drugs, such as morphine, modulate nociception by stimulating the G-protein-coupled μ opioid receptors (μ ORs), the major molecular gate for opiate analgesia¹. It is well documented that neither the analgesic nor adverse pharmacological activities of morphine can be detected in mutant mice lacking μ OR². This explains the difficulty in separating the beneficial and adverse effects of μ OR agonists. Pharmacological studies have long suggested the existence of different subtypes of μ OR, and the possibility of dissociating analgesia from several opioid adverse effects^{3–5}, yet without success. Recently, truncated μ OR splice variants⁶ have also been proposed as targets to improve benefit/risk ratio of opiate analgesics⁷. Several other strategies have been developed to try to reduce opioids' adverse effects, such as the use of either agonists of other opioid receptors^{8,9} or peripheral μ OR antagonists (for example, methylnaltrexone¹⁰ and alvimopan¹¹). However, the former ones produce a limited analgesia¹² and the latter ones need to be co-prescribed with opioids and prevent constipation but not morphine central adverse effects such as respiratory depression¹³. Alternatively, a better comprehension of signalling pathways and downstream effectors from μ OR that are potentially involved in opiates' analgesic effects would facilitate finding new targets for analgesic compounds with higher benefit/risk ratio. Although not completely understood, binding of morphine to μ OR results in the activation of a $G_{i/o}$ protein, inhibition of adenylate cyclase and activation of phospholipase C, and consequently, inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} channels as well as activation of K^+ channels¹⁴. G protein-activated inwardly rectifying K^+ (GIRK) channels were considered as prominent K^+ channels in opioid-induced analgesia¹⁵. However, studies using the GIRK-channel inhibitor tertiapine¹⁶, or GIRK knockout (KO) mice^{16,17}, demonstrated only a partial role for these channels in the antinociceptive effect mediated by high doses of morphine.

The TREK-1 channel is a member of the two-pore domain K^+ (K_{2P}) channel family with background activity¹⁸. It is expressed in sensory neurons, particularly in nociceptors¹⁹, and is also broadly distributed in the central nervous system¹⁸. We have previously demonstrated the role of this channel in polymodal pain perception^{19,20}. Moreover, recent data have shown an enhancement of TREK-1 activity in response to the activation of $G_{i/o}$ -coupled receptors^{21,22}. Consequently, we evaluated the implication of the TREK-1 channel in the antinociceptive effect and in the main adverse effects of morphine using TREK-1 KO mice and their wild-type littermates.

In this study, we show the major involvement of the TREK-1 channel as an effector of μ OR in the analgesic effect of morphine. Interestingly, we also observe that this channel is not involved in usual adverse effects of morphine such as constipation, respiratory depression and dependence. These observations suggest that direct activation of the TREK-1 channel, acting downstream from the μ OR, might have strong analgesic effects without opioids-like adverse effects.

Results

The analgesic effect of morphine involves TREK-1. The analgesic effect of morphine was assessed using thermal nociceptive pain tests. First, in accordance with previous results¹⁹, we observed that *TREK-1*^{-/-} mice demonstrated a higher sensitivity as compared with wild-type mice in the tail immersion test at 46 °C (see Supplementary Fig. S1a), whereas no difference was observed in the hot-plate test at 52 °C (see Supplementary Fig. S1b). We then assessed, in naive mice, the involvement of TREK-1 in the antinociceptive effect of morphine by measuring the withdrawal latencies at both temperatures. The

effect of morphine was determined by calculating the variation between pretreatment and post-treatment latencies for each animal. The assessment of the kinetics of the antinociceptive effect of systemic administrations of increasing doses of morphine (1, 3 and 5 mg kg⁻¹, subcutaneous (s.c.)) demonstrated a significant decrease in analgesia in *TREK-1*^{-/-} mice compared with their *TREK-1*^{+/+} littermates in the two tests (areas under the time course curves were decreased: -40.3% and -47.1% in the tail immersion test at 3 and 5 mg kg⁻¹ of morphine, respectively; -66.0% and -59.7% in the hot-plate test, respectively) (Fig. 1a,b right panels). This decrease was confirmed when comparing both scores at the peak effect (Fig. 1a,b left panels) and by another experiment using 1, 3, 5, 10 and 20 mg kg⁻¹ of morphine, in which the mean (\pm s.e.m.) ED50 values in the tail immersion test were 13.3 \pm 1.1 and 9.2 \pm 0.6 mg kg⁻¹ in *TREK-1*^{-/-} mice and their *TREK-1*^{+/+} littermates, respectively (n = 10 per dose). Furthermore, this study shows a more important contribution of TREK-1 deletion in morphine analgesia for the lowest doses: 55, 58, 35 and 21% for 3, 5, 10 and 20 mg kg⁻¹, respectively (see day 1 scores in Fig. 2b,c). Taken together, these results demonstrate that TREK-1 is a major effector of morphine-induced thermal analgesia. Similarly, there was a strong reduction (-80.0%) in the analgesic activity of fentanyl (0.03 mg kg⁻¹, s.c.), a μ OR selective agonist, in *TREK-1*^{-/-} mice (Supplementary Fig. S2). Interestingly, intrathecally administered tertiapin, a GIRK-channel inhibitor, partially decreased the antinociceptive effect of a high dose of morphine (5 mg kg⁻¹, s.c.) but did not affect the antinociceptive effect of 3 mg kg⁻¹ of morphine (Supplementary Fig. S3).

Since morphine is used to treat severe acute and chronic pain in humans²³, such as postoperative pain and, in some cases, neuropathic pain, we investigated the role of TREK-1 channels in pathological pain models. We tested the antihyperalgesic effect of morphine in a post-surgical pain model induced by a plantar incision of the mouse left hindpaw²⁴ and in a neuropathic pain model following chronic constriction injury by ligature of the left sciatic nerve²⁵. Areas under the time course curves of morphine (3 mg kg⁻¹, s.c.)-induced antihyperalgesia were strongly reduced in *TREK-1*^{-/-} mice compared with *TREK-1*^{+/+} littermates in the paw immersion test at 46 °C, 48 h post surgery (-44.6%) and 14 days after chronic constriction injury (-34.6%) (Fig. 1c,d, respectively). These results clearly demonstrate that TREK-1 is a downstream effector of μ OR involved in morphine-induced analgesia.

Tolerance to morphine is a phenomenon closely linked to its analgesic effect as it corresponds to a reduction of its effect after a prolonged exposure. A prolonged 6-day treatment of two daily injections of high doses of morphine (cumulative dose of 130 mg kg⁻¹, s.c.) (Fig. 2a) significantly decreased the analgesic potency of a single dose of morphine (3, 5, 10 or 20 mg kg⁻¹, s.c.) in *TREK-1*^{+/+} mice (-72.6%, -56.1%, -41.9% and -51.2%, respectively) (Fig. 2b), while this tolerance did not appear in the absence of the channel, in *TREK-1*^{-/-} mice for the dose of 3 mg kg⁻¹ (s.c.) of morphine. In this genotype, a small degree of tolerance was observed at 5 mg kg⁻¹ (s.c.) (-34.8%), while it increased for higher doses (-50.6% and -77.5% for 10 and 20 mg kg⁻¹, s.c., respectively) and became not statistically different from that observed in littermates (Fig. 2c). This is further evidence of an important contribution of the TREK-1 channel to the analgesic effect of morphine, especially at doses up to 5 mg kg⁻¹ (s.c.), which are commonly used to assess the analgesic effect of morphine.

We confirm, using electrophysiology (patch-clamp) technique, that a functional coupling exists between μ OR and the TREK-1 channel. When the two proteins were co-expressed in COS cells, morphine activated the TREK-1 channel (Fig. 3a,b). Moreover,

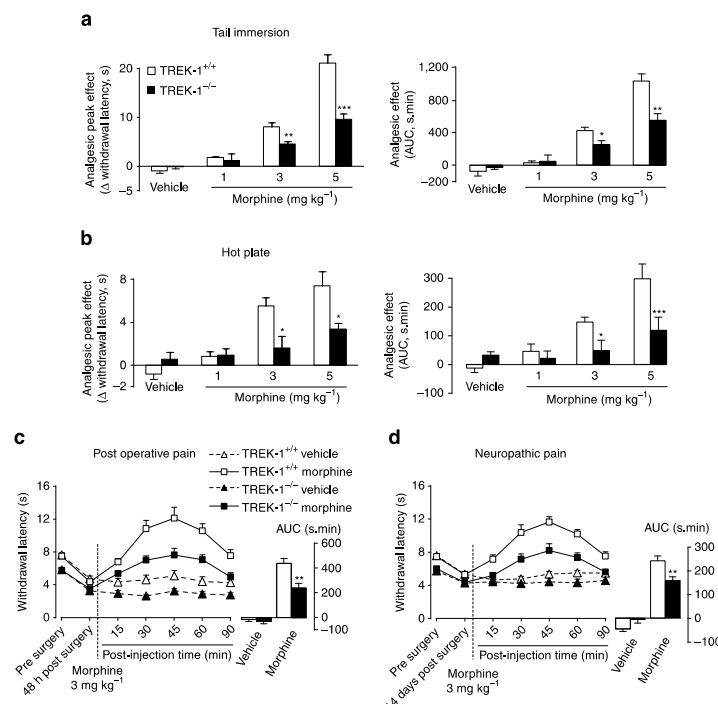


Figure 1 | Involvement of the TREK-1 channel in morphine-induced analgesia. (a,b) Antinociceptive effect of systemic administration of morphine in healthy wild-type and *TREK-1*^{-/-} mice littermates assessed by the tail immersion test (46 °C) (a) or the hot-plate test (52 °C) (b). Mice were injected either with morphine (1, 3 or 5 mg kg⁻¹, s.c.) or saline. Pre- and post- (15, 30, 45, 60 and 90 min after) treatment withdrawal latencies were assessed. For the two parts, (a,b), data are represented, on the right panels, as the mean ± s.e.m. of the areas under the time course curves (AUC, s.min) of analgesia scores (differences between post- and pretreatment withdrawal latencies) and, on the left panels, as the mean ± s.e.m. of the peak effect 30 min after injection. *n* = 8–10 per dose for each genotype. A significant decrease in systemic morphine-induced analgesia was observed in healthy *TREK-1*^{-/-} mice as compared with *TREK-1*^{+/+} animals. (c,d) Antihyperalgesic effect of systemic administration of morphine in wild-type and *TREK-1*^{-/-} mice assessed by the paw immersion test (46 °C) following induction of a postoperative pain model (plantar skin and muscle incision) (c) or a neuropathic pain model (chronic constriction injury of the sciatic nerve) (d). Baseline latencies were recorded before surgery and the antihyperalgesic effect of morphine was assessed 48 h and 14 days after surgery for postoperative pain and neuropathic pain models, respectively. Mice were injected either with morphine (3 mg kg⁻¹, s.c.) or saline. Pre- and post- (15, 30, 45, 60 and 90 min after) treatment, pain thresholds were assessed. Data for c,d represent mean ± s.e.m. The inset shows the mean ± s.e.m. of AUC of analgesia scores (differences between post- and pretreatment withdrawal latencies). *n* = 8–10 per dose for each genotype. A significant decrease in morphine-induced antihyperalgesia was observed in *TREK-1*^{-/-} mice as compared with *TREK-1*^{+/+} animals. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *post-hoc* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *TREK-1*^{+/+} versus *TREK-1*^{-/-}.

the functional coupling was lost with a serine 333 to aspartic acid mutant of the TREK-1 channel (TREK-1S333D) that mimics phosphorylation of the channel on the regulatory serine 333 by PKA and diminishes basal current²⁶ (Fig. 3c,d). Thus serine 333, the main amino acid of TREK-1 involved in PKA-dependent phosphorylation^{22,27}, appears to be essential for the activation of the channel by morphine.

TREK-1 is not involved in morphine-induced adverse effects. Constipation is the most usual complaint of patients treated with morphine²⁸. We assessed the role of TREK-1 in the effect of morphine on gastrointestinal function by the quantification of fecal *boli* production in mice. To assure that both genotypes eat similarly, food consumption was monitored during 24 h for each

mouse strain and expressed as grams of food ingested. No difference was observed between TREK-1-deficient mice and their wild-type littermates (Supplementary Fig. S4). Morphine (1, 3 and 5 mg kg⁻¹, s.c.) induced a dose-dependent suppression of defecation in both groups of mice with no significant difference concerning the weight of stools collected over the 2-h period following the treatment with morphine (Fig. 4a). To further study the potential role of TREK-1 in the effect of morphine on gastrointestinal transit, we compared small intestinal transit times by following the progression of a methylene blue dye given by oral gavage. Morphine (1, 3 or 5 mg kg⁻¹, s.c.), administered 20 min before methylene blue ingestion, induced a dose-dependent reduction of the gastrointestinal transit (Fig. 4b) with no difference between genotypes, suggesting that TREK-1 does not interfere with the inhibitory effect of morphine on the

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms3941

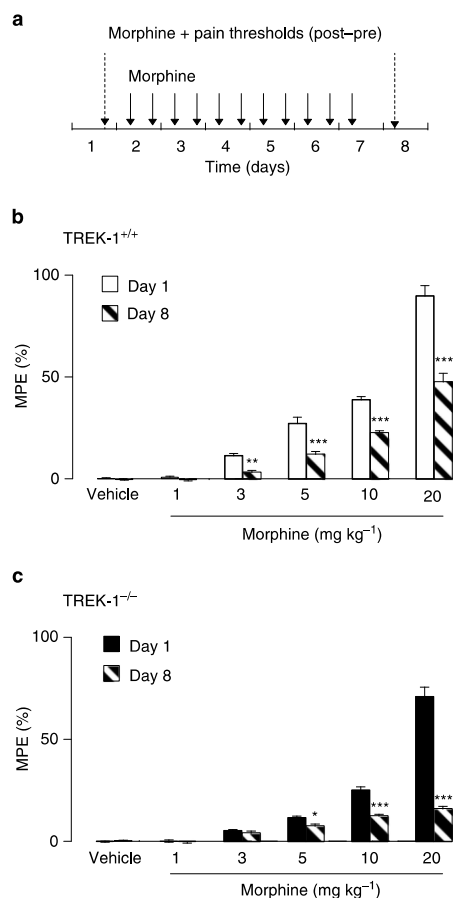


Figure 2 | Involvement of the TREK-1 channel in morphine-induced tolerance to analgesia. Degree of tolerance, represented by the loss of morphine-induced analgesic effect in TREK-1^{+/+} and TREK-1^{-/-} mice after a 6-day treatment in the tail immersion test (46°C). Comparison of morphine-induced analgesia (1, 3, 5, 10 or 20 mg kg⁻¹, s.c.) or saline effect before (day 1) and after (day 8) a repeated morphine treatment (10 mg kg⁻¹, s.c., twice a day on days 2–6 and once on day 7) (**a**) in TREK-1^{+/+} mice (**b**) and in TREK-1^{-/-} mice (**c**). Data are represented as mean ± s.e.m. of percentage of the maximal possible effect (MPE) = 100 × ((test withdrawal latency – baseline latency)/(cutoff – baseline latency)). *n* = 12–13 per dose for each genotype. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *post-hoc* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, day 1 versus day 8 for (**b,c**).

motility of the small intestinal portion of the gastrointestinal tract. We next assessed whether morphine differentially affects colonic motility in TREK-1^{-/-} mice and TREK-1^{+/+} littermates. *Ex vivo* recordings of isolated colon showed similar changes of migrating myoelectric complexes of the colonic muscular wall (Fig. 4c,d) in TREK-1^{-/-} and TREK-1^{+/+} mice. Indeed, morphine (1 μM) similarly induced a disorganized motor activity in the proximal part of the colon, whereas it totally

inhibited contractile activity in the intermediate and distal colon. Thus, while strongly involved in the analgesic effect of morphine, the TREK-1 channel appears not to be involved in this frequent adverse effect.

Acute respiratory depression is a μOR-dependent adverse effect of morphine, which can have critical consequences as it may lead to death in the most severe cases. We analysed the breathing frequency of TREK-1^{-/-} mice and their wild-type littermates using whole-body plethysmography following administration of saline or high doses of morphine. Resting breathing frequency was not different between wild-type and TREK-1^{-/-} mice, and both saline and morphine (5 mg kg⁻¹) treatments did not alter breathing frequency in either genotype (Fig. 5). Whatever the genotype, morphine administration at higher doses of 10, 20 or 50 mg kg⁻¹ s.c., largely above analgesic doses, induced a progressive and severe decrease in the respiratory rate (Fig. 5) with the same intensity in the TREK-1^{-/-} and TREK-1^{+/+} mice, which excludes an involvement of TREK-1 in this adverse effect.

Chronic administration of morphine can also induce dependence with typical withdrawal symptoms when treatment is discontinued²⁹. In humans, several signs such as anxiety, agitation and insomnia are observed. In mice, it is possible to assess this adverse effect through naloxone-precipitated withdrawal syndrome. Mice were injected twice a day for 6 days with high doses of morphine (cumulative dose of 130 mg kg⁻¹, s.c.) and, on day 7, a withdrawal syndrome was induced by a single injection of the non-selective opioid receptor antagonist naloxone (2 mg kg⁻¹, intraperitoneal (i.p.)) (Fig. 6a). No difference was observed between TREK-1^{-/-} and TREK-1^{+/+} mice in scores of the assessed behavioural symptoms of morphine withdrawal—that is, the number of escape jumps, teeth chattering or paw tremour (Fig. 6b–d).

Discussion

In this study, we found that the background K⁺ channel TREK-1 is involved in the analgesic effect of morphine but not in several adverse effects of this drug. Added to the known involvement of TREK-1 in the physiology of pain^{19,20}, the present results thus suggest the great interest of TREK-1 as a target for new analgesic compounds with a good benefit/risk ratio.

The TREK-1 channel appears to be a major contributor to the systemic morphine analgesic effect assessed both in acute pain tests and in models of pathological pain, which makes the demonstration of its involvement clinically relevant. Deletion of the TREK-1 channel results in a strong inhibition of the antinociceptive effect of morphine (3 mg kg⁻¹, s.c.) in both the tail immersion and the hot-plate tests (from 40% reduction of analgesic efficacy in the tail immersion test to 66% in the hot-plate test), confirmed by an increase of 45% of its ED₅₀ in TREK-1^{-/-} mice compared with littermates. A similar reduction in the morphine analgesic effect was observed in pathophysiological models of post-surgical or neuropathic pain. This demonstrates that a functional link between μOR and the TREK-1 channel is needed for analgesia. TREK-1 involvement in morphine-induced antinociception occurs at lower analgesic doses than for GIRK channels. In comparison we found, in agreement with the literature¹⁷, that GIRK channels are only involved in the antinociceptive effect at higher doses of morphine (5 mg kg⁻¹). Moreover, we demonstrate here that morphine-induced μOR activation leads to an increased TREK-1 current through PKA regulatory serine 333 in the C-terminal domain of the channel, as morphine-induced TREK-1 activation is suppressed when this amino acid is mutated. It is well documented that morphine reduces cAMP and PKA activities;

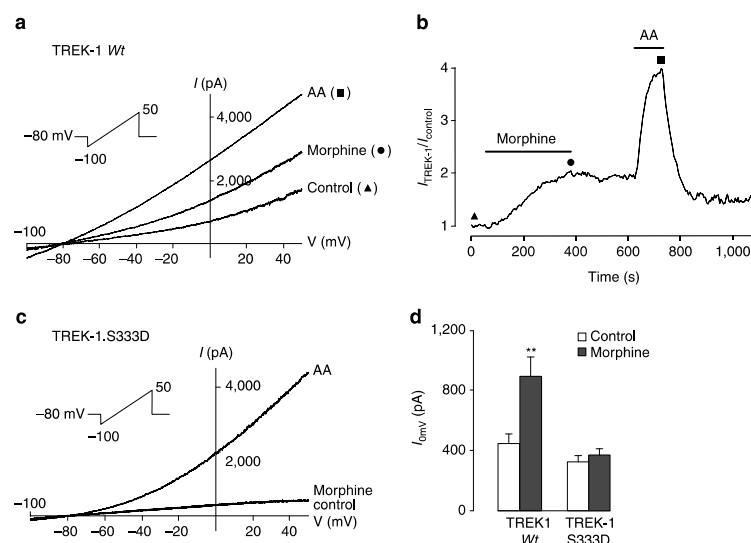


Figure 3 | Evidence of the functional coupling between μ OR and TREK-1 in COS cells. (a), I-V curves of TREK-1 channels elicited by voltage ramps (-100 to $+50$ mV, 800 ms) applied every 20 s on COS cells expressing the wild-type TREK-1 channel, in presence of $10 \mu\text{M}$ morphine or $10 \mu\text{M}$ arachidonic acid (AA) acutely perfused on the cell, or in control condition. (b) Characteristic current trace showing the activation of TREK-1 current, measured at 0 mV, by perfusion of $10 \mu\text{M}$ morphine followed by $10 \mu\text{M}$ arachidonic acid. (c) I-V curves acquired on COS cells expressing the mutant TREK-1.S333D channel in presence of $10 \mu\text{M}$ morphine, $10 \mu\text{M}$ AA or in control condition. (d) Mean \pm s.e.m. of wild-type TREK-1 and TREK-1.S333D current intensity in presence of $10 \mu\text{M}$ morphine and in control condition, recorded at 0 mV. Morphine significantly increased wild-type TREK-1 current ($n=10$, $**P<0.005$, Wilcoxon matched pairs test) but had no effect on the mutant channel ($n=6$, Wilcoxon matched pairs test).

thus, it can be proposed that morphine might alleviate the tonic PKA inactivation of TREK-1 channels, which would hyperpolarize the plasma membrane and depress neuronal activity in the pain pathway. A similar increase in TREK-1 current has been described with the activation of the $G_{\alpha i}$ -coupled GPCR mGlu4 involving PKA phosphorylation on serine 333 (ref 21). Moreover, an increase in TREK-2 current, closely related to the TREK-1 channel, has been observed following activation of the $G_{\alpha i}$ -coupled receptor $GABA_B$. Baclofen, a $GABA_B$ agonist, has been shown to depress the adenylate cyclase/cAMP/PKA pathway and to reduce the tonic inhibition of PKA on TREK-2 channel, which reduced the excitability of stellate neurons by generating membrane hyperpolarization³⁰. Interestingly, mGlu4 and $GABA_B$ agonists have been shown to possess an analgesic effect^{31–34}.

This interaction between morphine and TREK-1 is supposed to be located at the central level, as morphine is a centrally acting analgesic drug. At the spinal level, where morphine is known to act on the pain nervous pathway, μ ORs are located on synaptic terminals where they reduce the neurotransmitter release³⁵, while somatic and dendritic receptors induce a strong hyperpolarization of the neuron. This may result from an inhibition of calcium channels or from a direct effect on the release machinery downstream from the calcium entry, as well as from membrane hyperpolarization through the activation of K^+ channels^{36,37}. Similarly to μ OR, the TREK-1 channel is located both in pre- and post-synaptic compartments of the central nervous system^{38–40}. Thus, TREK-1 disinhibition by morphine through the activation of μ OR may take place at the presynaptic afferences where it would limit the excitatory neurotransmitter release. Or, on the other hand, activation of postsynaptic TREK-1 channels may

participate in the morphine-induced inhibition of secondary projection neurons. The hyperpolarization caused by TREK-1 opening might increase the voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA receptors³⁹ and therefore reduce neurotransmission⁴¹. TREK-1 could therefore participate in the spinal inhibitory effect of morphine on pain transmission, in combination with GIRK channels, located at the postsynaptic level^{42,43}.

Tolerance to the analgesic effect of morphine implies that the amount of drug required to elicit pain relief must be increased to maintain analgesia. Opioid tolerance is usually associated with a decrease in opioid receptor sensitivity and expression in the plasma membrane, and with alterations of signalling mechanisms. It has been proposed that chronic exposure to morphine tonically enhances the cAMP pathway via the superactivation of adenylate cyclase and alters gene expression through the cAMP-responsive element-binding protein phosphorylation and expression^{44,45}. The cAMP/PKA pathway inhibits the TREK-1 channel²⁷, and therefore chronic exposure to morphine could lead to constitutive TREK-1 inhibition. Considering the role that we observe for TREK-1 in morphine analgesia, inhibition of TREK-1 could explain the tolerance to the analgesic effect of low doses of morphine and the reduction in tolerance to these doses in TREK-1 KO mice compared with their wild-type littermates. This reinforces the idea of an important contribution of the TREK-1 channel in the antinociceptive and antihyperalgesic effects of morphine and confirms that the TREK-1 channel can be considered as a downstream effector of μ OR involved in the opioid-induced analgesia. However, the reduced influence of TREK-1 in analgesia and especially in tolerance induced by high doses of morphine, shown in KO mice, suggests that other effectors than TREK-1 could be involved, which is in line with

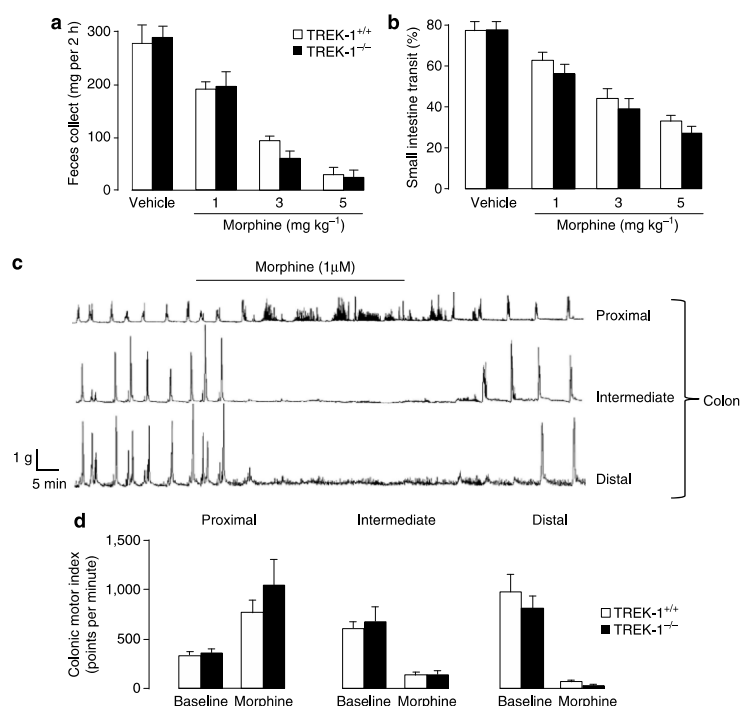


Figure 4 | Lack of involvement of the TREK-1 channel in morphine-induced constipation. (a) Evaluation of global fecal boli. Mice were treated with morphine (1, 3 or 5 mg kg⁻¹, s.c.) or saline. Total defecation was weighed over a 2-h period after treatment. Data are represented as the mean \pm s.e.m., $n=8-9$ per dose for each genotype. (b) Evaluation of gastrointestinal transit. Mice were treated with morphine (1, 3 or 5 mg kg⁻¹, s.c.) or saline before they were orally given a solution of methylene blue. Mice were killed 30 min later and the percentage of small intestine stained, showing the distance travelled by the dye through the gastrointestinal tract, was measured. Data are represented as the mean \pm s.e.m., $n=8-9$ per dose for each genotype. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, TREK-1^{+/+} versus TREK-1^{-/-}. (c,d) Ex vivo evaluation of morphine-induced constipation. (c) Example of migrating motor complexes (MMCs) recording in a colon isolated from a TREK-1^{+/+} mouse. The circular muscle tensions recorded in the proximal, intermediate and distal zones of the colon, reflecting the spontaneous contractile activity, are shown. A 1- μ M morphine perfusion disorganized the motor activity in the proximal part of the colon, whereas it totally inhibited the contractile activity of the intermediate and distal zones. (d) Comparative MMC index values obtained from TREK-1^{+/+} and TREK-1^{-/-} mice in the proximal, intermediate and distal colon. After resampling the tension curves at 30 points per second, the number of points above the basal threshold value, considered as colonic contractile activity, was counted. Data are represented as the mean \pm s.e.m., $n=3-4$ per genotype.

previous studies suggesting an involvement of GIRK channels for these doses^{16,17}.

Morphine induces several adverse effects in humans as well as in rodents. At analgesic doses, the inhibition of gastrointestinal transit occurs, and constipation is a recurring complaint among patients under prolonged opioid treatment. This has motivated recent innovative therapeutic approaches to reduce it⁴⁶. Interestingly, contrary to its antinociceptive effect, morphine-induced reduction in gastrointestinal tract function was unchanged in TREK-1 KO mice; all parameters tested were identical in both genotypes. This result is consistent with the recent observations that the nitrgic-induced inhibition of neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract, an important factor in morphine-induced constipation⁴⁷, does not involve TREK-1 channels⁴⁸. It demonstrates that analgesia and constipation, two usual effects of opioids, do not involve the same mechanisms downstream from μ OR. Therefore, they may be dissociated. This is a very important finding because of the high prevalence of constipation in patients treated with opioids⁴⁹, and

the observation that for some patients in advanced illness opioid-induced constipation can rival distress caused by pain⁵⁰.

At higher doses, morphine induces a decrease in respiratory frequency, and this can have critical consequences, especially in the case of overdose⁵¹ or in patients with respiratory failure⁵². Opioids induce respiratory depression by a number of mechanisms and neuronal sites of action⁵³, including the pre-Botzinger complex of the ventrolateral medulla, which makes this effect mechanistically complex. Again, contrary to its antinociceptive effect, morphine-induced decrease in the respiratory rate was unchanged in TREK-1 KO mice, excluding the involvement of this channel in this adverse opioid effect.

Chronic exposure to morphine also leads to dependence, which is apparent through the withdrawal syndrome triggered by the abrupt discontinuation of morphine exposure. Although correlations have been described between tolerance and dependence^{54,55}, evidence of independent mechanisms between these two phenomenon also exists⁵⁶. Our present work demonstrates, for

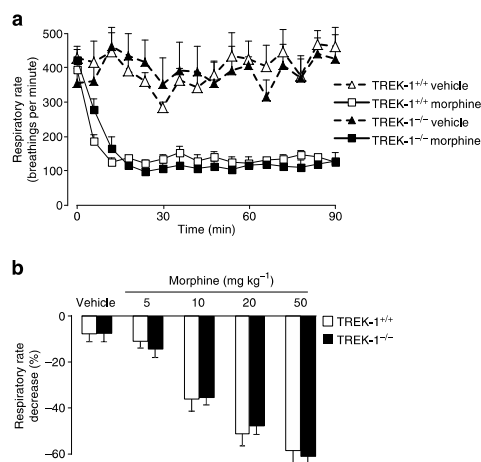


Figure 5 | Lack of involvement of the TREK-1 channel in morphine-induced respiratory depression. Evaluation of morphine-induced respiratory depression. **(a)** Respiratory rate curves of TREK-1^{+/+} and TREK-1^{-/-} mice following administration of morphine (50 mg kg⁻¹, s.c.) or saline. **(b)** Percentage of respiratory rate decrease in TREK-1^{+/+} and TREK-1^{-/-} mice following administration of morphine (5, 10, 20 or 50 mg kg⁻¹, s.c.) or saline. Data are represented as the mean \pm s.e.m., $n = 5$ –12 per dose for each genotype. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, TREK-1^{+/+} versus TREK-1^{-/-}.

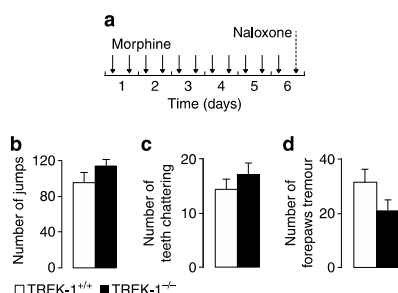


Figure 6 | Lack of involvement of the TREK-1 channel in morphine-induced dependence. Evaluation of morphine-induced dependence. Mice received repeated administrations of morphine over a 6-day period (10 mg kg⁻¹, s.c., twice a day on days 1–5, once on day 6) and were subsequently treated with naloxone (2 mg kg⁻¹, i.p.) on the last day **(a)**. Behavioural response to withdrawal, characterized by jumps **(b)**, teeth chattering **(c)** and forepaw tremor **(d)** were recorded over a 30-min period. Data are represented as the mean \pm s.e.m., $n = 8$ –10 per dose for each genotype. Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test.

all the symptoms explored, that the TREK-1 channel is not involved in the naloxone-induced withdrawal syndrome to chronic exposure to morphine. This observation, together with a recent work showing only a very modest contribution of all TREK channels in opioid-induced reward-related behaviour⁵⁷, excludes the TREK-1 channel from a role in morphine-induced dependence and distinguishes it from GIRK channels that have

clearly been involved in this effect of morphine. Indeed, Cruz *et al.*¹⁷ have demonstrated that GIRK channels, possibly via the postsynaptic inhibition of the adrenergic neurons of the locus coeruleus, constitute an inhibitory gate for the induction of dependence.

Taken together, our results show for the first time that there is a major involvement of the TREK-1 channel in the analgesic effect of μ OR agonists both in acute nociceptive and painful pathological conditions and that this channel is not involved in the usual adverse effects of acute or chronic exposure to morphine such as constipation, respiratory depression and dependence. This demonstrates that analgesic and some of the most common adverse effects of morphine are mediated by different effectors downstream from μ OR. Acting downstream μ OR, directly on the TREK-1 channel, would be expected to provide an opportunity to dissociate the analgesic from the major adverse effects of opioids for pain therapies. Therefore, the TREK-1 channel could be a target of choice to design novel analgesic compounds as effective as morphine but devoid of its main adverse effects, which could be a major progress in the pharmacological therapy of pain. However, validation of this concept needs to perform studies with specific TREK-1 activators and it would be interesting to determine the lack of depressive effect of these compounds because of the antidepressant phenotype of TREK-1 KO mice⁵⁸.

Methods

Animals. TREK-1^{-/-} mice have been generated by homologous recombination leading to the deletion of exon 3, which encodes the TM1 domain of the channel⁴¹. Heterozygous TREK-1-deficient mice were then backcrossed with C57Bl/6J congenic mice (Charles River, France) over 10 generations. All animals (TREK-1^{+/+} and TREK-1^{-/-}) were 8- to 12-week-old males of N6f2 to N10f2 backcross generation. Mice were housed in grouped cages in a temperature-controlled environment with food and water *ad libitum*. The behavioural experiments were performed blind to the genotype and to the treatment, in a quiet room, by the same experimenter for a given test, and taking great care to avoid or minimize discomfort of the animals.

All animal procedures were approved by the local Animal Ethics Committee (Comité d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale en Auvergne, CEEA-02, France) and experiments were performed according to the guidelines provided by the European Community guiding in the care and use of animals (86/609/CEE).

Drugs. The following drugs were used: morphine hydrochloride (1–50 mg kg⁻¹ for *in vivo* experiment and 1 μ M for *in vitro* experiments) (Cooper, Melun, France), fentanyl (0.03 mg kg⁻¹), naloxone hydrochloride (2 mg kg⁻¹), tertiapine (30 pmol) and methylene blue (1 mg ml⁻¹) (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l., Lyon, France). All drugs were prepared just before use in 0.9% (w/v) NaCl solution, except for methylene blue dissolved in a 10% dextrose solution.

Behavioural assessment of analgesic effect of morphine. Several experimental series were performed: the first one to comparatively determine the kinetics (15, 30, 45, 60 and 90 min after treatment) of the effect of morphine in healthy WT and KO mice using two tests of thermal nociception (the heated water immersion assay and the hot-plate test); the second one to establish the ED50 of morphine in both genotypes at the peak effect (30 min after treatment); and the last one to determine kinetics in neuropathic and post-surgical pain models.

For the heat water immersion assay, water temperature was kept constant at 46.0 ± 0.2 °C using a thermoregulated water bath. Mice were maintained under a soft cloth except their tail/left hindpaw, which was immersed in water until withdrawal was observed (cutoff time of 40 s)⁵⁹.

For the hot-plate test, mice were placed on the plate (52.0 ± 0.2 °C) and latencies to the first response characterized by the following signs were assessed: licking, shaking hindpaws or jumping (cutoff time of 40 s)⁶⁰.

Unilateral peripheral mononeuropathy was induced in mice anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg kg⁻¹, i.p.) with three chromic gut (4-0) ligatures tied loosely (with about 1-mm spacing) around the common sciatic nerve²⁵. The nerve was constricted to a barely discernable degree, so that circulation through the epineurial vasculature was not interrupted. Heat sensitivity was tested 14 days after surgery by immersing the ipsilateral hindpaw to the partial nerve ligature of gently restrained mice in a water bath at 46 °C.

The plantar incisional pain model was operated as initially described by Brennan *et al.*²⁴ Mice were anaesthetized with isoflurane 2.5%, and the skin of the operated foot was cleaned with povidone iodine 10% (Merck) and placed in the

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms3941

hole of a sterile drape. A 5-mm longitudinal incision was made through the skin and the fascia of plantar face of the left hindpaw, starting at 2 mm from the proximal edge of the heel. The plantar muscle was then incised longitudinally keeping attention to leave muscle origins intact. Behavioural pain test was performed 48 h after surgery by immersing the ipsilateral hindpaw to the surgery of gently restrained mice in a water bath at 46 °C.

Naloxone-precipitated withdrawal syndrome. Animals were first given twice daily morphine injections ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s.c.}$) for 6 days (and one final injection on day 7)⁶¹. Withdrawal was precipitated on day 7 by injecting naloxone (2 mg kg^{-1} , i.p.) 2 h after the final administration of morphine⁶². Ten minutes before naloxone treatment, mice were placed in a transparent acrylic box (20 cm in diameter, 60 cm high) to habituate to the new environment. Immediately after naloxone challenge, each mouse was placed back in the box gently, and the frequency of naloxone-precipitated withdrawal signs (escape jumps, teeth chattering, paw tremor) was recorded for 30 min. These symptoms were only seen following withdrawal. We have performed additional experiments by submitting wild-type mice to a 6-day regimen of saline injections followed by naloxone injection (2 mg kg^{-1} , i.p.). We failed to see any signs of withdrawal in this case.

Tolerance paradigm. The tail immersion test was used to determine tolerance paradigm. On the first day, baselines (drug-free pain thresholds) were first established; then mice were tested 30 min after subcutaneous administration of 0, 1, 3 or 5 mg kg^{-1} morphine. From the next morning on, mice received two daily morphine injections ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s.c.}$) for 6 days (only one injection on day 7)⁶¹. Finally, on day 8, mice were re-tested using tail immersion as described for day 1. Comparison between day 1 and day 8 allowed evaluating the development of morphine tolerance. It is indicated by a significant decrease in analgesic effect of morphine on day 8 as compared with day 1.

Assessment of respiratory effect of morphine. Whole-body plethysmography was performed in a noninvasive manner^{63,64}, using an eight-chamber barometric plethysmograph apparatus (Emka Technologies, VA, USA) allowing the simultaneous monitoring of several animals of each genotype in parallel. The integrated software analysis (IOX, Emka Technologies, VA, USA) was used for calculation of the respiratory frequency. Mice were habituated to the chamber for 15 min prior to injection. Analysis of respiratory frequency over the 15-min habituation period revealed that the last 5 min produced relatively steady respiratory frequency. Therefore, breathing rate in this period was used to normalize the drug-induced effects over the 1.5-h test period.

Assessment of gastrointestinal effect of morphine. Fecal *boli* accumulation was evaluated on mice that were housed together prior to the test and provided food and water *ad libitum*. To assure that both genotypes were similarly eating, food consumption was monitored (grams of food consumed in 24 h) and normalized per mouse. Mice were then treated with saline or morphine ($1, 3$ or 5 mg kg^{-1} , s.c.) and placed individually in Plexiglass boxes with a grid floor. Fecal *boli* were collected and weighed 2 h post-treatment.

Gastrointestinal transit was evaluated on mice that have received an injection of 0.1 ml of methylene blue-labelled 10% dextrose solution, using oral gavage. Thirty minutes later, the mice were killed. The stomach was clamped with a string above the lower oesophageal sphincter and a string beneath the pylorus to prevent the leakage of methylene blue. The intestinal transit was measured from the pylorus to the most distal point of migration of methylene blue. It was expressed as the percentage of total intestinal length^{65,66}.

Colonic migrating motor complexes were measured as described by Fida *et al.*⁶⁷ The entire colon was removed and placed in a dish containing modified Krebs's solution (see composition below) at 4 °C, flushed of faecal material and the mesentery was dissected away. A stainless steel, side-hole tube inserted through the lumen of the colon was used to secure the preparation into an organ bath that was continuously perfused with modified Krebs's solution (3 ml min^{-1}) containing (in mM) the following: NaCl 120, KCl 5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaHCO_3 25, glucose 11 and CaCl_2 2.5, bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 and maintained at 36.0 ± 0.5 °C. Three stainless steel hooks were inserted through the *muscularis externa* perpendicular to the long axis of the colon. The hooks were placed 1.5 cm apart and about 2 cm from each end of the colon. Each hook was hung up on a Grass FT03 isometric force transducer to record circular muscle contractions from the proximal, intermediate and distal parts of the colon, respectively. Tension, which was initially set to below 10 mN, was monitored continuously using an MP150 interface and was recorded on a PC running Acknowledge 3.7.2 software (BIOPAC systems, Santa Barbara, CA, USA).

Electrophysiological experiments. COS cells were plated at a density of 20,000 cells per 35-mm petri dish and grown at 37 °C in DMEM containing 10% of fetal bovine serum and 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin). Transfections were performed using the JetPEI reagent 1 day after plating, according to the supplier's protocol. Briefly, cells were incubated 4–6 h with a mix of pIRES2-muOR-EGFP, pIRES2-TREK-1-EGFP or the mutant pIRES2-TREK-1S333D-

EYFP, and JetPEI ($2 \mu\text{l}$ per μg of plasmids)³⁸. TREK-1-S333D mutant is analogous to the phosphorylated form of TREK-1 thus to the PKA-mediated inhibited form of the channel. Transfected cells, identified by their green fluorescence, were used for whole-cell voltage-clamp recordings 2–4 days after transfection. We used the whole-cell voltage-clamp configuration of the patch-clamp technique to measure membrane currents from transfected COS-7 cells. Current levels were measured at 0 mV as the difference with current levels at -80 mV , the reversal potential for K^+ . In control experiments with COS cells transfected with μOR , there was no activation of endogenous currents by $10 \mu\text{M}$ morphine or $10 \mu\text{M}$ arachidonic acid ($n=4$, $P>0.1$, Wilcoxon matched pairs test (Supplementary Fig. S5)). Recordings were made at room temperature using an axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) with a 3-kHz low-pass filter (Krohn-Hite). Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1440 A-D/D-A converter (Axon Instruments) and recorded on a hard drive using the pClamp software (version 10, Axon Instruments). Patch pipettes ($1\text{--}4 \text{ M}\Omega$) contained (in mM) the following: 135 KCl, 5 NaCl, 2 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES (pH 7.25 with KOH) and the control bath solution contained (in mM) the following: 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Drugs of interest were dissolved at their final concentration in the control bathing solution and were applied to individual patch-clamped cells using a home-made microperfusion system driven by microsolenoid valves (Sirai, Italy) allowing rapid solution changes.

Statistical analysis. Data, expressed as mean \pm s.e.m., were analysed using Sigma STAT Software version 3.0 for Windows (STAT32 Software Inc., San Diego, CA, USA). The specific tests used are indicated within the text of the figure legends.

References

1. Kieffer, B. L. & Gavériaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* **66**, 285–306 (2002).
2. Matthes, H. W. *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**, 819–823 (1996).
3. Ling, G. S., Spiegel, K., Lockhart, S. H. & Pasternak, G. W. Separation of opioid analgesia from respiratory depression: evidence for different receptor mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 149–155 (1985).
4. Ling, G. S., MacLeod, J. M., Lee, S., Lockhart, S. H. & Pasternak, G. W. Separation of morphine analgesia from physical dependence. *Science* **226**, 462–464 (1984).
5. Heyman, J. S., Williams, C. L., Burks, T. F., Mosberg, H. I. & Porreca, F. Dissociation of opioid antinociception and central gastrointestinal propulsion in the mouse: studies with naloxonazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 238–243 (1988).
6. Majumdar, S. *et al.* Truncated G protein-coupled mu opioid receptor MOR-1 splice variants are targets for highly potent opioid analgesics lacking side effects. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 19778–19783 (2011).
7. Majumdar, S. *et al.* Synthesis and evaluation of aryl-naloxamide opiate analgesics targeting truncated exon 11-associated mu opioid receptor (MOR-1) splice variants. *J. Med. Chem.* **55**, 6352–6362 (2012).
8. Vanderah, T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin. J. Pain* **26**(Suppl 10): S10–S15 (2010).
9. Pradhan, A. A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C. & Kieffer, B. L. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 581–590 (2011).
10. Stephenson, J. Methylaltraxone reverses opioid-induced constipation. *Lancet Oncol.* **3**, 202 (2002).
11. Webster, L. *et al.* Alvimopan, a peripherally acting mu-opioid receptor (PAM-OR) antagonist for the treatment of opioid-induced bowel dysfunction: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study in subjects taking opioids for chronic non-cancer pain. *Pain* **137**, 428–440 (2008).
12. Riviere, P. J. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 1331–1334 (2004).
13. Bates, J. J., Foss, J. F. & Murphy, D. B. Are peripheral opioid antagonists the solution to opioid side effects? *Anesth. Analg.* **98**, 116–122 table of contents (2004).
14. Zuo, Z. The role of opioid receptor internalization and beta-arrestins in the development of opioid tolerance. *Anesth. Analg.* **101**, 728–734 table of contents (2005).
15. Ocana, M., Cendan, C. M., Cobos, E. J., Entrena, J. M. & Baeyens, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 203–219 (2004).
16. Marker, C. L., Stoffel, M. & Wickman, K. Spinal G-protein-gated K^+ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. *J. Neurosci.* **24**, 2806–2812 (2004).
17. Cruz, H. G. *et al.* Absence and rescue of morphine withdrawal in GIRK/Kir3 knock-out mice. *J. Neurosci.* **28**, 4069–4077 (2008).
18. Fink, M. *et al.* Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K^+ channel. *EMBO J.* **15**, 6854–6862 (1996).

19. Alloui, A. *et al.* TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* **25**, 2368–2376 (2006).
20. Noel, J. *et al.* The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* **28**, 1308–1318 (2009).
21. Cain, S. M., Meadows, H. J., Dunlop, J. & Bushell, T. J. mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol. Cell Neurosci.* **37**, 32–39 (2008).
22. Noel, J., Sandoz, G. & Lesage, F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* **5**, 402–409 (2011).
23. Zollner, C. & Stein, C. Opioids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 31–63 (2007).
24. Brennan, T. J., Vandermeulen, E. P. & Gebhart, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* **64**, 493–501 (1996).
25. Bennett, G. J. & Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87–107 (1988).
26. Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J. J. & Bayliss, D. A. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* **280**, 30175–30184 (2005).
27. Patel, A. J. *et al.* A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* **17**, 4283–4290 (1998).
28. Bell, T. J. *et al.* The prevalence, severity, and impact of opioid-induced bowel dysfunction: results of a US and European Patient Survey (PROBE 1). *Pain Med.* **10**, 35–42 (2009).
29. McQuay, H. Opioids in pain management. *Lancet* **353**, 2229–2232 (1999).
30. Deng, P. Y. *et al.* GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K⁺ channels. *Neuron* **63**, 230–243 (2009).
31. Smith, G. D. *et al.* Increased sensitivity to the antinociceptive activity of (+/-)-bacclofen in an animal model of chronic neuropathic, but not chronic inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology* **33**, 1103–1108 (1994).
32. Chen, S. R. & Pan, H. L. Distinct roles of group III metabotropic glutamate receptors in control of nociception and dorsal horn neurons in normal and nerve-injured Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 120–126 (2005).
33. Goudet, C. *et al.* Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. *Pain* **137**, 112–124 (2008).
34. Malcangio, M. & Tomlinson, D. R. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* **76**, 151–157 (1998).
35. Pan, Y. Z., Li, D. P., Chen, S. R. & Pan, H. L. Activation of mu-opioid receptors excites a population of locus coeruleus-spinal neurons through presynaptic disinhibition. *Brain Res.* **997**, 67–78 (2004).
36. Law, P. Y., Wong, Y. H. & Loh, H. H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signalling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 389–430 (2000).
37. Heinke, B., Gingl, E. & Sandkuhler, J. Multiple targets of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent Adelta- and C-fibers. *J. Neurosci.* **31**, 1313–1322 (2011).
38. Maingret, F. *et al.* TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* **19**, 2483–2491 (2000).
39. Lauritzen, I. *et al.* Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* **19**, 1784–1793 (2000).
40. Sandoz, G. *et al.* AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J.* **25**, 5864–5872 (2006).
41. Heurteaux, C. *et al.* TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* **23**, 2684–2695 (2004).
42. Yoshimura, M. & North, R. Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin. *Nature* **305**, 529–530 (1983).
43. Marker, C. L. *et al.* Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *J. Neurosci.* **25**, 3551–3559 (2005).
44. Nestler, E. J. & Aghajanian, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**, 58–63 (1997).
45. Taylor, D. A. & Fleming, W. W. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 11–18 (2001).
46. Becker, G. & Blum, H. E. Novel opioid antagonists for opioid-induced bowel dysfunction and postoperative ileus. *Lancet* **373**, 1198–1206 (2009).
47. Iwata, H., Tsuchiya, S., Nakamura, T. & Yano, S. Morphine leads to contraction of the ileal circular muscle via inhibition of the nitrergic pathway in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **574**, 66–70 (2007).
48. Gil, V. *et al.* Relative contribution of SKCa and TREK1 channels in purinergic and nitrergic neuromuscular transmission in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G412–G423 (2012).
49. Kalso, E., Edwards, J. E., Moore, R. A. & McQuay, H. J. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain* **112**, 372–380 (2004).
50. Thomas, J. *et al.* Methylnaltrexone for opioid-induced constipation in advanced illness. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2332–2343 (2008).
51. Hall, A. J. *et al.* Patterns of abuse among unintentional pharmaceutical overdose fatalities. *JAMA* **300**, 2613–2620 (2008).
52. Macintyre, P. E., Loadmon, J. A. & Scott, D. A. Opioids, ventilation and acute pain management. *Anaesth. Intensive Care* **39**, 545–558 (2001).
53. Pattinson, K. T. Opioids and the control of respiration. *Br. J. Anaesth.* **100**, 747–758 (2008).
54. Way, E. L., Loh, H. H. & Shen, F. H. Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **167**, 1–8 (1969).
55. Rezvani, A. & Way, E. L. Hypersensitivity of the opioid-tolerant guinea pig ileum to electrical stimulation after abrupt agonist removal. *Life Sci.* **33**(Suppl 1): 349–352 (1983).
56. Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* **408**, 720–723 (2000).
57. Mirkovic, K., Palmersheim, J., Lesage, F. & Wickman, K. Behavioural characterization of mice lacking Trek channels. *Front. Behav. Neurosci.* **6**, 60 (2012).
58. Heurteaux, C. *et al.* Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* **9**, 1134–1141 (2006).
59. Janssen, P. A., Niemegeers, C. J. & Dony, J. G. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* **13**, 502–507 (1963).
60. Ohlsson, L. Algesimetric studies by the hot plate method in mice. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* **9**, 322–331 (1953).
61. Bogulavsky, J. J. *et al.* Deletion of the glutamate receptor 5 subunit of kainate receptors affects the development of morphine tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 579–587 (2009).
62. Liaw, W. J. *et al.* Distinct expression of synaptic NR2A and NR2B in the central nervous system and impaired morphine tolerance and physical dependence in mice deficient in postsynaptic density-93 protein. *Mol. Pain* **4**, 45 (2008).
63. Drorbaugh, J. E. & Fenn, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**, 81–87 (1955).
64. Hamelmann, E. *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 766–775 (1997).
65. De Winter, B. Y. *et al.* Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase and guanlyl cyclase on endotoxin-induced delay in gastric emptying and intestinal transit in mice. *Shock* **18**, 125–131 (2002).
66. Watkins, C. C. *et al.* Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *J. Clin. Invest.* **106**, 373–384 (2000).
67. Copel, C., Clerc, N., Osorio, N., Delmas, P. & Mazet, B. The Nav1.9 channel regulates colonic motility in mice. *Front. Neurosci.* **7**, 58 (2013).

Acknowledgements

We wish to thank Valérie Julia for providing the plethysmometric apparatus and Florian Lesage for providing knockout mice. This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV4-022-01; ANR-09-MNPS-037-01), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (DEQ 20130326482), the Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur, région Auvergne and FEDER, Fondation Hamel.

Author contributions

J.B. and M.D. conducted the experiments, analysed the data and participated in the preparation of the manuscript. A.A. participated to initiate the work and to behavioural experiments. J.N. conducted electrophysiological experiments and participated in the preparation of the manuscript. P.D. and B.M. were involved in experiments on colonic muscular wall activity. S.L. and V.P. were associated with behavioural experiments. M.C. and E.D. conducted electrophysiological experiments. A.E. and M.L. supervised the project, participated in data analysis and manuscript preparation.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Devilliers, M. *et al.* Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 4:2941 doi: 10.1038/ncomms3941 (2013).

ARTICLE 2

ARTICLE IN PRESS

PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxxPAIN[®]

www.elsevier.com/locate/pain

Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception

Vanessa Pereira^{a,b,1}, Jérôme Busserolles^{a,b,1}, Marine Christin^{d,e,h,1}, Maïly Devilliers^{a,b}, Laura Poupon^{a,b}, Wassim Legha^{a,b}, Abdelkrim Alloui^{a,b}, Youssef Aissouni^{a,b}, Emmanuel Bourinet^{f,g,h}, Florian Lesage^{d,e,h}, Alain Eschalier^{a,b,c}, Michel Lazdunski^{d,e}, Jacques Noël^{d,e,h,*}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, Clermont-Ferrand, France

^b Inserm, U 1107, Neuro-Dol, Clermont-Ferrand, France

^c CHU Clermont-Ferrand, Service de pharmacologie, Clermont-Ferrand, France

^d Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

^e CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Valbonne, France

^f Universités de Montpellier 1 et 2, Montpellier, France

^g CNRS, Institut de Génétique Fonctionnelle, UMR-5203, Département de Physiologie, Montpellier, France

^h LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2014

Received in revised form 29 August 2014

Accepted 11 September 2014

Available online xxxx

Keywords:

Thermosensation

Mechanosensation

TREK2

Background potassium channel

Oxaliplatin chemotherapy-induced

neuropathy

ABSTRACT

Two-pore domain background K⁺ channels (K2p or KCNK) produce hyperpolarizing currents that control cell membrane polarity and neuronal excitability throughout the nervous system. The TREK2 channel as well as the related TREK1 and TRAAK channels are mechanical-, thermal- and lipid-gated channels that share many regulatory properties. TREK2 is one of the major background channels expressed in rodent nociceptive neurons of the dorsal root ganglia that innervate the skin and deep body tissues, but its role in somatosensory perception and nociception has remained poorly understood. We now report that TREK2 is a regulatory channel that controls the perception of non aversive warm, between 40 °C and 46 °C, and moderate ambient cool temperatures, between 20 °C and 25 °C, in mice. TREK2 controls the firing activity of peripheral sensory C-fibers in response to changes in temperature. The role of TREK2 in thermosensation is different from that of TREK1 and TRAAK channels; rather, TREK2, TREK1, and TRAAK channels appear to have complementary roles in thermosensation. TREK2 is also involved in mechanical pain perception and in osmotic pain after sensitization by prostaglandin E2. TREK2 is involved in the cold allodynia that characterizes the neuropathy commonly associated with treatments with the anticancer drug oxaliplatin. These results suggest that positive modulation of the TREK2 channel may have beneficial analgesic effects in these neuropathic conditions.

© 2014 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The fine tuning of sensory perception is essential for the appropriate response to innocuous or noxious stimuli. In nociceptors, combinations of ion channels with stimulus-specific gating properties oppose or favor action potential generation to precisely tune the perception modalities of sensory fibers [9].

TREK1/KCNK2, TREK2/KCNK10, and TRAAK/KCNK4 are hyperpolarizing background K⁺ channels from the K2p channel family expressed in excitable and nonexcitable cells [19]. TREK1 is involved in vasodilatation, neuroprotection, anesthesia, depression, and morphine analgesia [10,17,25,26,53]. We have observed the involvement of TREK1 and TRAAK channels in nociception [5,51]. These 2 channels were the first of the mechano-gated K⁺ channels to be discovered [37,39,54] and we previously reported that TREK1 and TRAAK knockout mice have mechanical allodynia [5,51]. TREK1 and TRAAK are also thermosensitive channels whose activity increases 7- to 20-fold when temperature rises from 17 °C up to 42 °C to 45 °C [28,38,51]. Active at skin temperature, they contribute to resting membrane potential of sensory neurons, in which

* Corresponding author at: IPMC, UMR CNRS 7275, Université de Nice Sophia Antipolis, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. Tel.: +33 4 93 957 720; fax: +33 4 93 957 708.

E-mail address: noel@ipmc.cnrs.fr (J. Noël).

¹ V.P., J.B., and M.C. contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

0304-3959/© 2014 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

2

V. Pereira et al./PAIN^x xxx (2014) xxx–xxx

they are thought to dampen electrical activity. They are involved also in the control of noxious temperature perception [5,51]. TREK1 and TRAAK are positively modulated by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including arachidonic-acid [12–14,20,40]. TREK1, but not TRAAK, is constitutively regulated by GPCRs through PKA and PKC phosphorylation [41,48].

Despite the fact that TREK2 shares many functional properties with TREK1 and TRAAK channels [19,50], and that TREK2 mRNA was found in dorsal root ganglia (DRG) from mice, adult rats, and human beings [1,4,30,43,61], the role of TREK2 in sensory perception and pain remains poorly understood. Like TREK1 and TRAAK, TREK2 is a thermo- and mechano-gated K⁺ channel that is activated by lysophospholipids and PUFAs [7,28,34]. Like TREK1, it is regulated by G-protein-coupled receptors through PKA and PKC phosphorylation [15,27,30,34]. In rat DRG neurons, TREK2 dominates background channel activity [30]. A recent report has shown that downregulation of TREK2 channel expression in rat DRG neurons was associated with neuron depolarization, about 10 mV, and, in parallel, with spontaneous pain in a complete Freund's adjuvant (CFA)-induced model of inflammation [1]. Therefore, TREK2 may be an important channel in sensory perception and nociception. Here we describe the role of TREK2 channels in mechanosensation and thermosensation, and we show its implication in cold allodynia associated with the neuropathy caused by oxaliplatin, an anticancer drug. We use TREK2 knockout mice and triple TREK1-TREK2-TRAAK knockout mice to decipher the complementary roles of TREK2 and TREK1-TRAAK in thermosensation.

2. Methods

2.1. Animal behavior

2.1.1. Animals

All transgenic animals were mice of the N10F2 backcross generation to C57Bl/6J inbred congenic strain, as described previously [23,25]. TREK2^{-/-} mice RRID: MGI_MGI:3836808. Triple KO mice were generated by crossing TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice, resulting in TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} offspring. Triple knockout mice were obtained by intercrossing this progeny. Wild-type mice were littermates. Transgenic mice were bred on-site, kept on a 12-hour light/dark cycle, and provided with food and water ad libitum. The behavioral experiments were performed blind to the genotype, on 20 to 24-g male mice in a quiet room by the same experimenter for a given test, taking great care to minimize or avoid discomfort in the animals. All animal procedures were approved by the local Animal Ethics Committees (Comité d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale en Auvergne, C2E2A, and Comité Institutionnel d'Ethique pour l'Animal de Laboratoire - Azur (C2EA-28), France), and experiments were performed according to the guidelines provided by the European Community on the care and use of animals (86/609/CEE) [70].

2.1.2. Mouse mechanical sensitivity

Mechanical sensitivity was assessed with calibrated von Frey filaments (from 0.0045 to 5.4950 g). Filaments were applied 5 times in the order of increasing stiffness, perpendicularly to the plantar surface of the hind paw and pressed until they bent. The first filament that evoked at least one response was assigned as the pain threshold [60].

2.1.3. Flinch test

As previously described [3], mice were acclimated for 30 minutes in a transparent plastic box (35 × 35 cm). Mice were then injected with prostaglandin E₂ (PGE₂; 100 ng, 5 μ L) or vehicle

administered intradermally on the plantar face of the left hind paw using a 30-gauge needle connected to a 25- μ L Hamilton syringe by PE-10 polyethylene tubing. Thirty minutes after this injection, 10 μ L NaCl 2% hypertonic (607 mOsm) solution was administered at the same injection site. Mice behavior was observed for a 5-minute period starting immediately after hypertonic injection, and the time of licking and shaking the paw was recorded.

2.1.4. Immersion tests

The tail or the paw was immersed in a temperature-controlled water bath until withdrawal was observed (cutoff time, 30 seconds). Reaction scores were the result of 2 averaged separate withdrawal latency time determinations.

2.1.5. Hot-plate test

Mice remained on the plate (50 °C or 52 °C) until they started jumping or licking their forepaws. The average of 2 separate measures was taken as a pain parameter (cutoff time, 20 seconds) [52].

2.1.6. Thermal preference test

Two hot-/cold-plate analgesia meters (Bioseb, Marseille, France) were placed side by side such that the adjacent thermal surfaces at different temperatures were enclosed in a single chamber (32 × 16 cm). The temperature of each platform was controlled at ± 0.11 °C. The movement of the mice between the 2 plates was recorded with a video tracking system over 3 minutes. Thermal preference was measured by tallying the cumulative time spent on each plate [46].

2.1.7. Dynamic cold-plate test

Animals were placed on hot-/cold plate (Bioseb, France) enclosed with a transparent plastic box (16 × 16 cm). The surface temperature was cooled from 30 to 4 °C at the rate of 1 °C min⁻¹. Nocifensive behavior (jumps) was measured as a function of cooling [67].

2.1.8. Oxaliplatin-induced neuropathy

Mice were injected once intraperitoneally with oxaliplatin at 6 mg/kg (in glucose 5%). Cold sensitivity was assessed with place preference test and dynamic cold-plate test before and 90 hours after drug administration. The time point 90 hours corresponds to the peak of oxaliplatin-related cold hyperalgesia [16].

2.2. Quantitative real-time polymerase chain reaction

DRG pairs from lumbar segments L4 to L6 were dissected and pooled together. RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by the Agilent 2100 Bioanalyzer; samples with RIN greater than 8 were conserved for further analysis. Reverse transcription was performed with SuperScript II Reverse Transcriptase conforming to the Invitrogen-supplied protocol. Amplification was performed using Fast-Start SYBR Green (Roche), and DNA real-time amount was measured with a Mastercycler ep realplex (Eppendorf) thermocycler. Each triplicate mean cDNA relative quantity was calculated using a standard concentration curve and was normalized on housekeeping genes β -Glucuronidase (GUS) and Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

2.3. Single C-fiber recordings

The isolated skin-nerve preparation was used as previously described [56,68]. Adult mice, 8 to 16 weeks old, were anesthetized and killed with CO₂. The saphenous nerve and the skin of the hind limb were dissected and placed corium side up in an organ bath

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN^x (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

3

chamber superfused with synthetic interstitial fluid (SIF) composed of (in mmol/L): NaCl, 120; KCl, 3.5; MgSO₄, 0.7; NaH₂PO₄, 1.7; Na₂HCO₃, 5; CaCl₂, 2.0; Na-gluconate, 9.5; glucose, 5.5; sucrose, 7.5; and HEPES, 10; pH adjusted at 7.4. The saphenous nerve was placed in a recording chamber filled with mineral oil. Single fibers were teased and placed on a gold recording electrode. The units' receptive fields on the skin were stimulated with mechanical search stimuli applied with a glass rod, and conduction velocity was measured with electrical stimulation. C fibers were identified with conduction velocity of less than 1.2 m s⁻¹ and calibrated von Frey hair thresholds. For thermal stimulation, the fibers' receptive field on the skin was isolated from the perfusion chamber with a stainless steel ring 800 μm in diameter. The inside of the ring was perfused with temperature-controlled SIF through a temperature controller (CI-100, Warner Instrument). All experiments were carried out at a bath temperature of 30 °C. The highest temperature tested was 50.2 °C ± 0.1 °C, and the minimal temperature was 9.8 °C ± 0.1 °C (n = 20). Current traces were amplified with DAM 80 differential amplifier (World Precision Instruments), digitized with Digidata 1322A (Axon Instruments) and stored on a computer with the gap-free mode of pClamp 10 software (Axon Instruments). Action potential waveforms were detected off-line with threshold crossing set at more than twice the RMS of the background noise and the principal component analysis routine of Spike 2 software (Cambridge Electronic Design). Action potentials were visualized individually to detect false-positive results.

2.4. Statistical analysis

All statistical analysis was performed with Graphpad Prism4 software. Differences between groups (average data expressed as mean ± standard error of the mean [SEM]; n = number of animals, neurons or cells) were considered significant at *P* < .05. All statistical tests are indicated in the text and figure legends. Significance levels are provided in the figure legends.

3. Results

3.1. Mechanical allodynia and absence of sensitization to osmotic pain by PGE₂ in TREK2^{-/-} mice

Because TREK2 is a mechano-gated background K⁺ channel, like TREK1 and TRAAK channels, and therefore is a good candidate channel to play a role in mechanical perception, we tested the mechano-sensitivity of TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice. The plantar surface of the hind paw was stimulated with calibrated von Frey filaments of increasing stiffness. Both TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice showed significant reduction of paw withdrawal thresholds (Fig. 1a).

As the mechanosensitive TREK2 channel is gated by cell membrane stretch [7,34], we tested intradermal injection of a moderate hypertonic NaCl 2% solution (10 μL, 607 mOsm) in the right hind paw of the mice. NaCl 2% caused modest pain behavior in wild-type mice, which was not more pronounced in TREK2^{-/-} or TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 1b). The inflammatory mediator PGE₂ sensitizes nociceptors to hypertonicity [2,57]. Indeed, the pain response of wild-type mice to hypertonic NaCl 2% solution was strongly increased 30 minutes after injection of PGE₂ (100 ng, 5 μL) in the hind paw (Fig. 1b). Interestingly, PGE₂ had no significant effect on the response of TREK2^{-/-} or TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice to hypertonicity with an absence of significant sensitization to hypertonic pain (Fig. 1b). This suggests that TREK2 channel is needed for hyperalgesia induced by prostaglandins, which is in line with the previously shown ability of cAMP-coupled receptor pathways to negatively regulate TREK2 [41,50].

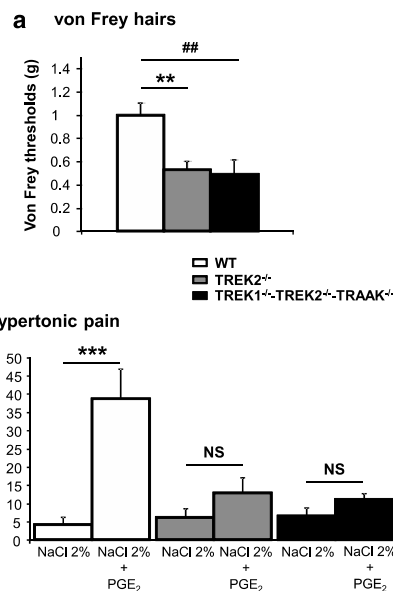


Fig. 1. TREK2 regulates mechanosensitivity in mice. Mechanosensitivity was assessed with paw withdrawal thresholds to von Frey hairs of increasing stiffness in TREK2^{-/-}, TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-}, and wild-type (WT) mice (*P* = .0096 for TREK2^{-/-} and *P* = .0051 for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} over WT mice. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test; n = 10 per group) (a). Intradermal injection of hypertonic saline solution (NaCl 2%, 10 μL) in the hind paw induced moderate pain behavior, assessed with time of licking or shaking the paw, in WT and TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (b). Prior sensitization with prostaglandin E₂ (PGE₂) injection in the hind paw (100 ng, 5 μL) sensitized the pain behavior caused by hypertonicity in WT mice but was without effect in TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (*P* < .0001 for WT NaCl 2% + PGE₂ v/s WT NaCl 2%, *P* > .99 for TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; n = 6–10 per group). (b). Values are mean ± standard error of the mean. NS, not significant.

3.2. Elevated perception of nonaversive warm temperatures in the absence of TREK2 channel

TREK1, TREK2, and TRAAK channels have steep temperature sensitivity [28,38] and TREK1 and TRAAK channels have been shown to be important for appropriate heat perception between 46 °C and 50 °C [5,51]. To assess the role of TREK2 and the overall role of TREK1, TREK2, and TRAAK channels in heat perception, we measured latencies for tail-flick reflex at nonaversive warm temperatures of 35 °C, 40 °C, and 42 °C, which have been shown to be temperatures of comfort for mice [47,55]. TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice showed lower withdrawal latencies, that is, enhanced sensitivity, than did wild-type mice at 40 °C and 42 °C (Fig. 2a). There was no difference in sensitivity between TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice at these temperatures.

We then studied the response to heat of peripheral nociceptive neurons with isolated skin-nerve recordings. The skin-nerve technique measures the activity of isolated C-fibers from the saphenous nerve when nociceptors in the skin are warmed from 30 °C to 50 °C in 60 seconds. The proportions of heat-sensitive C-fibers were significantly increased in TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 2b). Clearly there was a reduced thermal selectivity for C-fibers in both knockout mice, as the population of polymodal mechano-, heat-, and cold-sensitive C-fibers (C-MHC

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

4

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

fibers) increased whereas the fraction of mechano-heat C-fibers (C-MH) was conserved (Fig. 2b). Action potential firing of C-fibers during heat ramps, from 30 °C to 50 °C in 60 seconds, was also elevated in knockout mice compared to wild-type mice (wild-type C-fibers had 47 ± 8 spikes in 60 seconds, $n = 40$; TREK2^{-/-} C-fibers had 57 ± 11 spikes, $n = 44$; and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} C-fibers had 60 ± 8 spikes, $n = 64$; $P = .0078$ for TREK2^{-/-} and $P < .0001$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} over wild-type mice, 2-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test) (Fig. 2c). Furthermore, C-fiber threshold temperatures for firing the first action potential upon warming were lower in knockout mice compared to C-fibers from wild-type mice (median threshold temperatures 40.3 °C for wild-type mice; 35.7 °C and 36.9 °C for TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} mice, respectively, $P < .01$ for TREK2^{-/-} and $P < .05$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-}

over wild-type mice, Kruskal–Wallis test with Dunn post test). Approximately 80% of heat-sensitive C-fibers from both knockout mice were active at temperatures below 40 °C compared to less than 50% of the wild-type C-fibers (Fig. 2d). Spike-firing activities of C-fibers for both knockout mice were significantly above wild-type fiber activities at temperatures between 30 °C and 40 °C (Fig. 2e). As temperature was increased above 40 °C (between 40 °C and 50 °C), TREK2^{-/-} C-fibers were not more active than wild-type fibers (Fig. 2e). TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} C-fibers remained more active than wild-type fibers at temperatures between 40 °C and 50 °C, which is consistent with the increased activity of C-fibers from TREK1^{-/-} and TRAAK^{-/-} mice that was measured before [5,51] (Fig. 2e). Altogether, this shows that TREK2 channel is a strong regulator of C-fiber response to heat at temperatures below and around 40 °C.

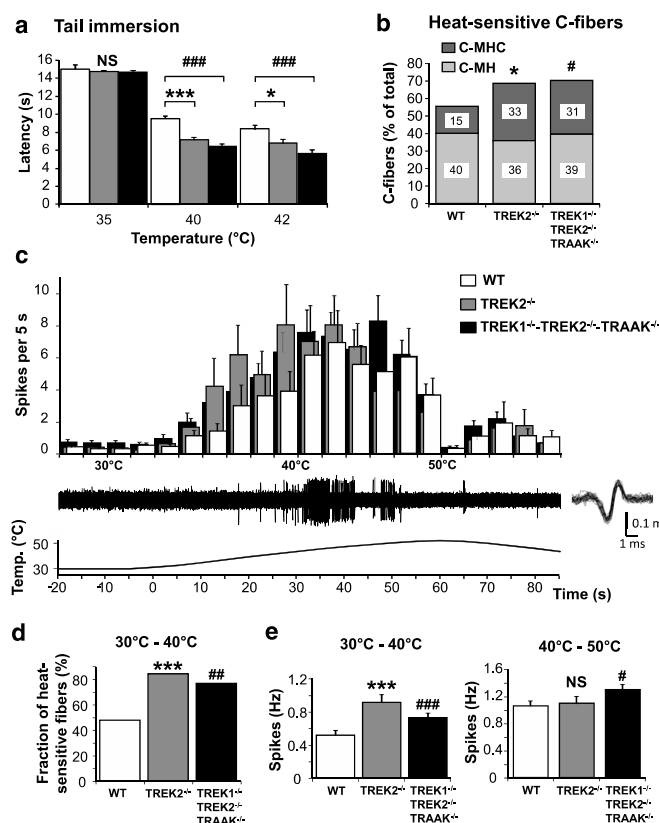


Fig. 2. Role of the TREK2 channel in the perception of warm temperatures. Tail flick latencies at 35 °C, 40 °C, and 42 °C of wild-type (WT), TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} mice ($P = .0014$ and $P = .023$ for TREK2^{-/-}, $P < .0001$, and $P = .0003$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} mice over WT mice; 2-way analysis of variance with Bonferroni post test; $n = 8–10$ mice per group) (a). Fractions of heat-sensitive C-fibers in WT (total number of C-fibers = 72), TREK2^{-/-} ($n = 64$ C-fibers), and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} ($n = 91$ C-fibers) mice observed with skin-nerve recordings (b). Numbers in bars are fractions of Mechano-Heat (C-MH) and Mechano-Heat-Cold (C-MHC) ($P = .04$ for TREK2^{-/-} and $P = .016$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} over WT; χ^2 test). Histogram of average numbers of spikes per 5-second bin for WT ($n = 42$), TREK2^{-/-} ($n = 44$), and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} ($n = 64$) heat-sensitive C-fibers in response to warming between 30 °C and 50 °C in 60 seconds. Example of a continuous recording of the response to heat of a C-fiber from a TREK2^{-/-} mouse (c). Right: superimposition of the first 20 action potentials during the heat response of the same fiber. Bottom: representative temperature ramp (c). Fractions of heat-sensitive C-fibers with activity below 40 °C ($P = .0002$ for TREK2^{-/-} and $P = .0012$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} over WT; χ^2 test) (d). Average firing frequencies of WT, TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} heat-sensitive C-fibers between 30 °C and 40 °C (left) ($P < .001$ for TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} over WT) and between 40 °C and 50 °C (right) ($P > .05$ for TREK2^{-/-} and $P < .001$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAAK^{-/-} over WT. Friedman test with Dunn post test) (e). Values are mean \pm standard error of the mean. NS, not significant.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

5

3.3. TREK2 does not regulate perception of noxious heat

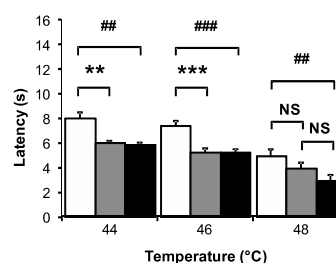
We then investigated the heat sensitivity of TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice at temperatures above 42 °C with the tail immersion test and the hot-plate test. These temperatures have been shown to be aversive temperatures for mice [55]. In the tail immersion test at 44 °C and 46 °C, both TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice had heat hyperalgesia (Fig. 3a). However, above 46 °C, no difference was observed in response latencies between TREK2^{-/-} and wild-type mice, whereas thermal hypersensitivity was observed up to 52 °C on the hot-plate test for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 3b).

3.4. Enhanced sensitivity to moderate cool temperatures in TREK2^{-/-} mice

We investigated the role of TREK2 in cold sensitivity. The contribution of TREK2 channels to the perception of innocuous cold temperatures was assessed with the tail immersion test and the temperature preference test at 20 °C and 25 °C. TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice had reduced withdrawal latencies, and therefore enhanced sensitivity, at both temperatures (Fig. 4a). In the temperature preference test, mice were free to explore 2 adjacent thermal plates set at different temperatures. This is a test of choice of better comfort temperature for mice. When both plates were at the same temperature, neither wild-type nor transgenic mice showed place preference (data not shown); however, when mice had the choice between adjacent plates at 25 °C and 30 °C, both TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice spent significantly less time than wild-type mice on the cooler plate at 25 °C (Fig. 4b), showing preference for the plate at 30 °C. When mice were given the choice of 2 plate temperatures between 20 °C and 30 °C, the temperature preference of TREK2^{-/-} mice was not significantly different from that of the wild-type mice, as mice from both strains spent about 70% of the time on the warmer plate (Fig. 4b). This shows that the TREK2 channel is a regulator for thermosensitivity at 25 °C. TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice spent significantly less time on the cooler plate at 20 °C than did wild-type mice. Healthy TREK1^{-/-} or TRAAK^{-/-} mice are not hypersensitive to cold [5,51]. The double TREK1^{-/-}-TRAAK^{-/-} knockout mice showed increased cold sensitivity at lower temperatures, below 18 °C, compared to TREK2^{-/-} mice [51].

In mice, cold sensation is carried by TRPM8 expressing DRG neurons [32,55], which have been identified for the most part as unmyelinated C-fibers [18,58,59]. Therefore, we investigated the response of peripheral C-fibers upon cooling of their receptive fields in the skin, from 30 °C to 10 °C in 1.5 minutes, with skin-nerve recordings (Fig. 4d). In agreement with previous studies [33,51], we found 35% of C-fibers sensitive to cold in wild-type mice (Fig. 4c). The fraction of cold-sensitive C-fibers was increased significantly in both TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 4c), with significantly more fibers active at moderately cold temperatures between 30 °C and 21 °C in TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 4e). Furthermore, spike firing response of C-fibers upon cooling was increased in TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice (Fig. 4e). Wild-type cold-sensitive C-fibers had an average of 37 ± 9 spikes (n = 25 fibers); TREK2^{-/-} cold-sensitive C-fibers had 73 ± 18 spikes (n = 32); and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} 53 ± 11 spikes (n = 41) over 1.5 minutes of cold stimulation (mean ± SEM, *P* < .001 for both knockout over wild-type C-fibers, 2-way ANOVA with Bonferroni post test). The spike firing activity of TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} fibers was also significantly higher than that of wild-type fibers between 30 °C and 21 °C (Fig. 4f). The median cold-threshold for the response of TREK2^{-/-} C-fibers was not significantly different from that of wild-type C-fibers. This was

a Tail immersion



b Hot plate

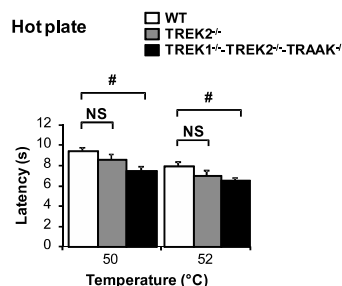


Fig. 3. Role of TREK2 channel for the perception of aversive heat. Tail flick latencies in tail immersion test for wild-type (WT), TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice in tail immersion test at bath temperatures of 44 °C, 46 °C, and 48 °C (respectively, *P* = .012, *P* = .015, and *P* > .05 [NS] for TREK2^{-/-}, and *P* = .0028, *P* = .001, and *P* = .0078 for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} over WT mice; 2-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test; *n* = 8–10 mice per group) (a). Latencies for heat pain response of paw licking or shaking on the hot-plate at 50 °C and 52 °C (*P* > .05 for TREK2^{-/-} at both temperatures (NS; *P* = .02 and *P* = .036 for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} over WT mice; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; *n* = 8–10 mice per group) (b). Values are mean ± standard error of the mean.

significantly different for the median cold threshold of TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} C-fibers, with an increase in median threshold temperature of 3.5 °C (median cold thresholds were 20.7 °C for wild-type C-fibers, 23.4 °C for TREK2^{-/-}, and 24.2 °C for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-}, *P* < .05 for TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} over wild-type C-fibers; Kruskal–Wallis test with Dunn post test). This argues that TREK2 controls the cold response of peripheral C-fibers at moderate, near-ambient, temperatures.

3.5. TREK2 does not contribute to thermosensation of noxious cold temperatures

We then tested the temperature sensitivity of TREK2 and TREK1-TREK2-TRAAK knockout mice at noxious cold temperatures with the test of tail immersion and the nocifensive dynamic cold-plate test. In the reflex tail immersion test, TREK2^{-/-} mice behaved like wild-type mice at 15 °C, 10 °C, and 5 °C, whereas TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice were hypersensitive to cold at all temperatures (Fig. 5a). Consistently, TREK2^{-/-} mice behaved like wild-type mice in the nocifensive test of the dynamic cold-plate, with escape behavior (jumps) observed at noxious cold temperatures between 8 °C and 4 °C (Fig. 5b). Again, TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-}-TRAAK^{-/-} mice showed a different thermosensitivity with clear escape behavior (jumps) at significantly higher temperatures between 15 °C and 12 °C (Fig. 5b), which shows they have enhanced cold temperature sensitivity. These experiments show that TREK2 is not involved in noxious cold temperatures sensitivity

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

6

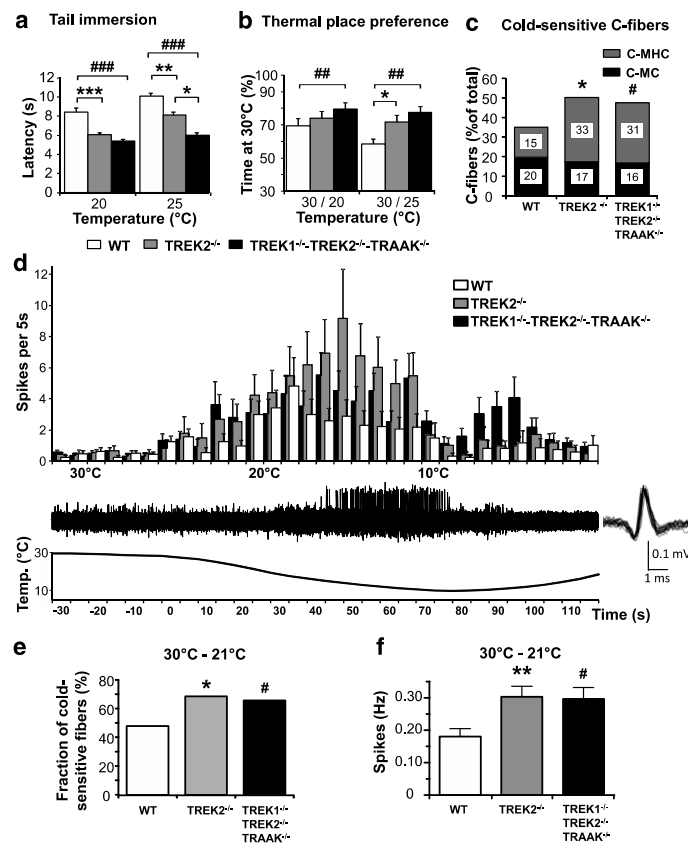
V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

Fig. 4. TREK2 regulates perception of moderate cold temperatures. Response latencies in tail immersion test at bath temperatures of 20 °C and 25 °C of wild-type (WT), TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice ($P = .0004$, $P = .014$, and $P = .006$, respectively for TREK2^{-/-}, $P < .0001$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT; 2-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test; $n = 9$ –10 mice per group) (a). Choice of preferred temperature in thermal-place preference test. Fraction of time spent on the control plate at 30 °C in a 2-plate temperatures choice test between 30 °C and 20 °C or 30 °C and 25 °C ($P = .016$ for TREK2^{-/-}, $P = .02$ and $P = .001$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; $n = 16$ mice per group) (b). Fractions of cold-sensitive C-fibers in WT (total number of C-fibers = 72), TREK2^{-/-} ($n = 64$ C-fibers), and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice ($n = 91$ C-fibers) measured in skin-nerve experiments. Numbers in bars are fractions of Mechano-Cold (C-MC) and Mechano-Heat-Cold-C-fibers (C-MHC) ($P = .024$ for TREK2^{-/-} and $P = .036$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT; χ^2 test) (c). Histogram of averaged responses to cooling, 5-second bin, of C-fibers from wild-type ($n = 25$ C-fibers), TREK2^{-/-} ($n = 32$ C-fibers), and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice ($n = 41$ C-fibers). Below: example continuous recording of the cold response of a C-fiber from a TREK2^{-/-} mouse. Right: superimposition of the first 20 action potentials during cold response of the same fiber. Bottom: representative cold ramp from 30 to 10 °C (d). Fractions of cold-sensitive C-fibers with activity between 30 °C and 21 °C (respectively 69% and 66% of TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} fibers, $P = .03$ over WT; χ^2 test) (e). Average firing frequencies of WT, TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} cold-sensitive C-fibers between 30 °C and 21 °C ($P < .001$ and $P < .05$, respectively, for TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT. Friedman test with Dunn post test) (f). Values are mean \pm standard error of the mean.

between 15 °C and 4 °C. However, TREK2 is a strong regulator of thermosensation in a range of temperatures between 25 °C and 20 °C, which activity is important for the appropriate perception of moderate cool temperature. In contrast, the cold response of TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice confirmed our previous observations that, together, TREK1 and TRAAK channels control the perception of noxious cold between 17–18 °C and 5 °C [51].

3.6. Role of TREK2 in cold sensitization in oxaliplatin-induced neuropathic pain conditions

We then explored the contribution of TREK2 to cold-hypersensitivity often observed in oxaliplatin-induced neuropathic pain

conditions [22]. Cancer therapy with oxaliplatin causes peripheral-nerve neuropathy that exacerbates cold-perception in nearly all patients treated [6]. In rodents, a single intraperitoneal injection of oxaliplatin induces a sensitization to cold that is maximal 90 hours after treatment [16,35]. We tested the cold sensitivity of oxaliplatin-treated TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice with the thermal place preference test, for choices of temperatures between 30 °C and 25 °C or 30 °C and 20 °C, and the nociceptive dynamic cold-plate test for the evaluation of noxious cold temperatures sensitivity. Wild-type mice treated with oxaliplatin significantly reduced the time that they spent on the thermal plates at test temperatures of 25 °C and 20 °C, when compared to pretreatment values (Fig. 5c). This showed an increased sensitivity

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

7

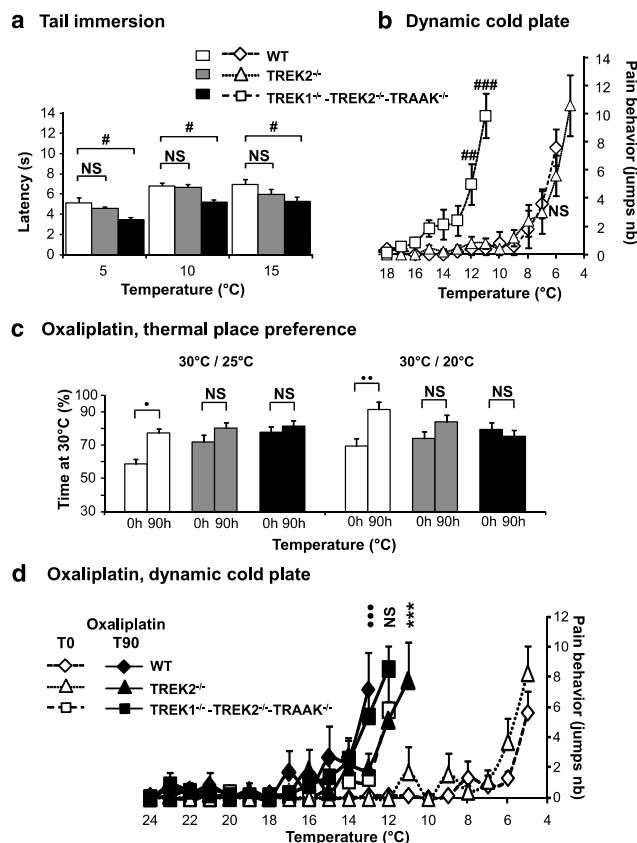


Fig. 5. TREK2 does not contribute to the perception of noxious cold temperatures. TREK2 is involved in cold sensitization associated with neuropathic conditions induced by oxaliplatin treatment. Response latencies in tail immersion test at both temperatures of 5 °C, 10 °C, and 15 °C of wild-type (WT), TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice (not significant [NS], $P > .05$ for TREK2^{-/-}, $P = .04$, $P = .04$, and $P = .02$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT; 2-way analysis of variance [ANOVA] with Bonferroni post test; $n = 9$ –10 mice per group) (a). Dynamic cold-plate test (-1 °C/min) with WT, TREK2^{-/-}, and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice. Measures of number of escape jumps per minute (NS, $P > .05$ for TREK2^{-/-}, $P = .003$, and $P < .0001$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} over WT; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; $n = 9$ or 10 mice per group) (b). Assessment of cold allodynia induced by oxaliplatin treatment in the thermal-place preference test for choices of temperatures between 30 °C and 25 °C (left) or between 30 °C and 20 °C (right), before treatment (0 h) and 90 hours (90 h) after intraperitoneal injection of oxaliplatin (6 mg/kg) (NS, $P > .05$ for TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} at 90 h v/s 0 h. Filled circles, $P = .019$ for WT at 90 h v/s 0 h for choice of temperatures between 30 °C and 25 °C. Filled diamonds, $P = .0011$ for WT at 90 h v/s 0 h for choice of temperatures between 30 °C and 20 °C; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; $n = 9$ or 10 mice per group; paired measures) (c). Sensitivity to cold in dynamic cold-plate test before treatment (T0, white marks) and 90 hours after oxaliplatin treatment (T90, dark marks) of WT (diamonds), TREK2^{-/-} (triangles), and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} (squares) mice (filled diamonds, $P < .0001$, for WT mice at T90 v/s T0; $P < .0001$, for TREK2^{-/-} mice at T90 v/s T0. NS, $P > .05$ for TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice at T90 v/s T0; 2-way ANOVA with Bonferroni post test; $n = 8$ –10 per group) (d).

of neuropathic mice to moderate cold. Interestingly, the temperature preference of TREK2^{-/-} and TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-} mice was not changed after oxaliplatin treatment (Fig. 5c), which suggests that TREK2 is involved in the cold hypersensitivity consecutive to oxaliplatin-induced neuropathy. We then investigated cold sensitivity of oxaliplatin-treated mice with the nocifensive dynamic cold-plate test. In the clinic, dynamic thermal testing was shown to discriminate patients with small-fiber neuropathies [44]. Oxaliplatin treatment exacerbated the perception of cold in wild-type and TREK2^{-/-} mice. The effect of oxaliplatin treatment was indistinguishable between TREK2^{-/-} and wild-type mice, which showed escape behavior from the dynamic cold-plate between 15 °C and 17 °C, at higher temperatures than healthy mice (Fig. 5d). Conversely, the behavior of TREK1^{-/-}TREK2^{-/-}TRAACK^{-/-}

mice did not change after oxaliplatin treatment (Fig. 5d). These experiments show that the TREK2 channel is one of the channels involved in hypersensitivity after oxaliplatin treatment. This also agrees with the role of TREK2 to control the appropriate perception of moderate cold temperatures.

Oxaliplatin treatment was previously shown to cause a remodeling of ion channel expression in nociceptors, including TREK1 and TRAAK channels [16]. We therefore measured TREK2 mRNA expression level in wild-type mice treated with oxaliplatin. TREK2 mRNA expression in lumbar DRGs was almost halved 90 hours after oxaliplatin injection (Supplementary Fig. 1b), which could justify the cold hypersensitivity at 20 °C and 25 °C that was observed in the wild type mice but not in TREK2^{-/-} mice.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

8

V. Pereira et al. / PAIN^x xxx (2014) xxx–xxx

4. Discussion

TREK1, TREK2, and TRAAK are mechanosensitive and thermosensitive K⁺ channels from an important family of background K⁺ channels [19]. The expression of TREK2 in sensory neurons and the multi-modal regulation of TREK2 channel activity [19,27–29,34,50] make it a good candidate channel to regulate sensory fibers activity and sensory perception. We have confirmed the expression of TREK2 mRNA in adult mice lumbar DRGs (Supplementary Fig. 1a). We have now studied the role of TREK2 channel in peripheral mechanosensitivity and thermosensitivity. We show that TREK1, TRAAK, and TREK2 channels have complementary roles in thermosensation.

TREK2^{−/−} mice have mechanical allodynia. Therefore, TREK2 modulates mechanosensation by increasing sensory thresholds to mechanical stimuli. Interestingly, TREK1^{−/−}-TREK2^{−/−}-TRAAK^{−/−} mice did not show significantly more pronounced allodynia than TREK2^{−/−} mice, which excludes compensatory mechanisms within the TREK and TRAAK channel family. It would have been interesting to analyze the possible co-expression of TREK2 with other channels of the same family TREK1 and TRAAK in mechanoreceptors; however, this has not been possible because of a lack of good enough antibodies or specific pharmacology to discriminate between these channels. The absence of TREK2, in TREK2^{−/−} mice, completely suppressed sensitization to osmotic pain by the pro-inflammatory mediator PGE₂. This resembles the response in TREK1^{−/−} mice and is unlike that in TRAAK^{−/−} mice that remained strongly sensitized to pain induced by hypertonicity after PGE₂ treatment [5,51]. Therefore TREK1 and TREK2 channels, but not TRAAK, are involved in osmotic pain hyperalgesia induced by PGE₂. This property agrees with the negative regulation of both TREK1 and TREK2 channels by cAMP/PKA downstream of the G-coupled PGE₂ receptor [34,38], which is not true for TRAAK channel.

TREK2^{−/−} mice have elevated temperature sensitivity between 40 °C and 46 °C. This is in the range of temperatures that is at the boundary between temperatures of comfort for mice, or temperatures of preference near ~40 °C, and aversive hot temperatures between 45 °C and 50 °C [55]. Therefore, TREK2 K⁺ channel activity is needed for the proper discrimination between warm perception and aversive noxious heat. In the absence of the TREK2 channel, temperatures that are not aversive, near 40 °C, are perceived as aversive. This suggests that positive modulation of the TREK2 channel may have anti-nociceptive efficacy without alteration of noxious heat perception.

We reported before that TREK1^{−/−} and TRAAK^{−/−} mice have heat hyperalgesia at noxious temperatures between 46 °C and 50 °C [5,51], and therefore exhibit very limited overlap with the range of temperatures that involve the TREK2 channel. The enhanced heat sensitivity of TREK1^{−/−}-TREK2^{−/−}-TRAAK^{−/−} mice between 40 °C and 52 °C corroborates these observations, because it covers the whole range of temperatures that are controlled by TREK1, TREK2, and TRAAK channels individually.

Hypersensitivity to heat of TREK2^{−/−} mice results from elevated heat response of peripheral nociceptive fibers. This was shown in skin-nerve recordings by an elevated response to heat of C-fibers from knockout mice. The fraction of heat-sensitive C-fibers increased by about 15% and heat-threshold temperatures of C-fibers were about 5 °C lower in both TREK2^{−/−} and TREK1^{−/−}-TREK2^{−/−}-TRAAK^{−/−} mice compared to wild-type mice. The activity of heat-sensitive C-fibers from both knockout mice was significantly above wild-type C-fibers activity between 30 °C and 40 °C. TREK2^{−/−} C-fibers were not more active than wild-type C-fibers for temperatures between 40 °C and 50 °C. These results indicate that TREK2 channel activity regulates warm-temperature perception in C-fibers, and that, above 40 °C, the role of TREK2 in C-fibers is very

limited. The apparent discrepancy between threshold temperatures in skin-nerve recordings and behavioral experiments was observed before with TREK1^{−/−} mice [5]. This is most probably due to the body temperature of the mice, which mitigates the temperature perceived by nociceptors in the skin.

The sensory discrimination between innocuous and noxious cold is not yet well understood yet. We previously showed that the combined activities of TREK1 and TRAAK channels control cold perception between 20 °C and 10 °C, whereas individually TREK1 and TRAAK channels do not influence cold perception in healthy mice [5,51]. We now have observed that TREK2 alone participates in the fine perception of innocuous cold between 25 °C and 20 °C, in the reflex tail immersion test. This was confirmed at 25 °C with a test of comfort temperature choice for mice, the place preference test. Conversely, in the nocifensive dynamic cold-plate test, TREK2^{−/−} mice behaved like wild-type mice with escape behavior at noxious cold temperatures from 8 °C to 4 °C. This argues that TREK2 does not contribute to aversive cold sensation in mice. TREK1^{−/−}-TREK2^{−/−}-TRAAK^{−/−} mice showed consistent cold hypersensitivity over a large range of temperatures between 25 °C and 5 °C, with tail immersion and temperature preference tests. Again, this shows that there is no redundancy or compensation between TREK and TRAAK channels in individual knockout mice for the sensation of cold temperatures. This also indicates that TREK2 and TREK1-TRAAK channels have complementary roles in cold sensation by regulating temperature perception in distinct, non overlapping ranges of cold temperatures. TREK1 and TRAAK channels are involved in aversive cold temperatures sensation, whereas TREK2 regulates the perception of innocuous moderate cool.

Cold hypersensitivity in TREK2^{−/−} mice results from an increased response of peripheral C-fibers to cold. Threshold response temperatures to cold in TREK2^{−/−} C-fibers did not change significantly compared to wild-type, although there was a tendency for an increase in median threshold temperature. This agrees with a role for TREK2 channels at moderate cold temperatures near skin temperature at 30 °C.

Because of the high occurrence of exacerbated cold sensitivity, with cold dysesthesia and cold allodynia, in cancer patients treated with oxaliplatin [6,66] and its impact on the quality of life of the patient and the continuation of their anti-cancer treatment, it is particularly interesting to observe that TREK2 is involved in the cold allodynia caused by oxaliplatin treatment. The reduced expression of TREK2 mRNA in lumbar DRGs of oxaliplatin treated mice is expected to increase the sensitivity of these mice to moderate cool temperatures, between 20 °C and 25 °C, as observed for TREK2^{−/−} mice. At temperatures below 20 °C, in the nocifensive dynamic cold-plate test, oxaliplatin-treated TREK2^{−/−} mice behaved like wild-type mice. This is fully consistent with the role of the TREK2 channel for the perception of moderate cold temperatures, TREK2 not being involved for the perception of aversive cold temperatures. Clearly, the cold hyperalgesia induced by oxaliplatin is a complex phenomenon that very probably involves dysregulation of several types of ion channels, particularly several types of K⁺ channels that have been shown to play a role in chronic pain [62]. It will be necessary to analyze other models of neuropathic pain, such as the traumatic pain model of chronic constriction injury of the nerve (CCI), to further establish the role of TREK2 in mechanical allodynia/thermal hyperalgesia.

Recordings of electrical activity of C-fibers from TREK1^{−/−}, TREK2^{−/−}, and TRAAK^{−/−} mice show that deletion of these background K⁺ channels does not cause ectopic action potential firing as was reported with inhibition of voltage-dependent K⁺ channels [31]. On the contrary, we observed that TREK2, TREK1, and TRAAK channels have complementary contributions with limited functional redundancy in thermosensation. Behavior experiments show that TREK2 controls thermosensation of moderate temperatures,

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. PAIN^x (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

9

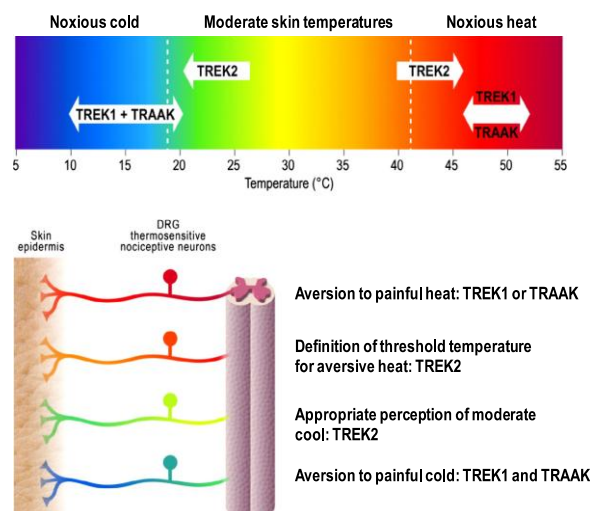


Fig. 6. Presentation of different ranges of temperatures for contribution of TREK2, TREK1, and TRAAK channels to thermosensation. Top panel: temperature range for contributions of TREK2, TREK1, or TRAAK channels to temperature perception (white arrows). TREK2 channel regulates thermosensation over moderate skin temperatures. TREK1 and TRAAK channels control perception of the more extreme temperatures outside temperature ranges involving the TREK2 channel. Together, TREK1 and TRAAK channels are implicated in the noxious cold range of temperature perception; separately, TREK1 and TRAAK channels regulate perception of aversive heat above 46 °C [5,50]. Dashed lines show pain thresholds for cold and heat in humans. The scheme below models the interactions among TREK2, TREK1, and TRAAK channels to describe their respective contributions to thermosensation.

between 40 °C and 46 °C for heat and between 20 °C and 25 °C for cold, whereas TREK1 and TRAAK channels, individually or in combination, control the perception of aversive temperatures, above 46 °C and below 17 °C [5,51] (Fig. 6). This is similar to results showing the respective contributions of the different heat-sensitive excitatory channels in temperature perception. At least 8 thermosensitive TRP channels are thought to contribute to temperature perception. Loss-of-function studies with TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPV4 knockout mice have shown that heat sensation is not completely abolished in the absence of any one of these receptors, which suggests a degree of functional redundancy [32,49,55,64]. Other channels such as TRPM3 have also been involved in heat perception [65]. The same type of situation has been reported for TRPM8, TRPA1, and TRPC5 in cold perception [21,42,69].

We have proposed before that thermosensitive TREK1 and TRAAK channels are regulators of thermosensitivity by opposing depolarization of nociceptors by excitatory channels in a temperature-dependent mode [51]. This interpretation also holds for the role of TREK2 channel in temperature perception. How does TREK2 channel control temperature perception at temperatures different from that controlled by TREK1 and TRAAK channels? It may be that TREK2 is distinctively expressed in a subpopulation of thermosensitive neurons dedicated to the perception of moderate nonaversive temperatures. This was proposed previously for both innocuous and noxious cold sensation by TRPM8-expressing neurons [32,55].

Because TREK2 is an important player in the drastic changes of thermosensation induced by treatment with oxaliplatin, which is associated with exacerbated cold sensitivity, it could be envisaged that activators of TREK2 would reduce cold allodynia in neuropathic conditions [8,62]. More generally, because of the role of TREK2 in various aspects of pain perception (this work and [1]), and considering the limited effects of TREK2 deletion in the brain

[45], an extensive search of a specific pharmacology would be worthwhile. Other K^+ channel types are also important for pain [11,24,36,62,63], and combinations of openers for TREK2 and other channel types might also be considered.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Nice Sophia Antipolis and the University of Auvergne, CNRS, INSERM and grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV4-022-01; ANR-09-MNPS-037-01), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, the Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur, région Auvergne and FEDER. The authors thank Valérie Friend for her technical help and Emmanuel Deval and Eric Lingueglia for reading and comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>.

References

- [1] Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson SN. TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J Neurosci* 2014;34:1494–509.
- [2] Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, Liedtke W, Levine JD. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *PAIN* 2005;118:70–9.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *PAIN*[®] (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

10

V. Pereira et al./PAIN[®] xxx (2014) xxx–xxx

- [3] Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB, Levine JD. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 2003;39:497–511.
- [4] Aller MI, Wisden W. Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 2008;151:1154–72.
- [5] Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschaliere A, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 2006;25:2368–76.
- [6] Attal N, Bouhassira D, Gauthron M, Vaillant JN, Mitry E, Lepere C, Rougier P, Guirmand F. Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *PAIN* 2009;144:245–52.
- [7] Bang H, Kim Y, Kim D. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* 2000;275:17412–9.
- [8] Bayliss DA, Barrett PQ. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:566–75.
- [9] Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 2008;4:14.
- [10] Blondeau N, Petrucci A, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res* 2007;101:176–84.
- [11] Callejo G, Giblin JP, Gasull X. Modulation of TREK background K⁽⁺⁾ channel by membrane stretch. *PLoS ONE* 2013;8:e64471.
- [12] Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E. Lysophosphatidic acid-operated K⁺ channels. *J Biol Chem* 2005;280:4415–21.
- [13] Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honore E. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J* 2005;24:44–53.
- [14] Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Sachs F, Lazdunski M, Honore E. Up- and down-regulation of the mechano-gated K₂P channel TREK-1 by PIP (2) and other membrane phospholipids. *PLoS Arch* 2007;455:97–103.
- [15] Deng PY, Xiao Z, Yang C, Rojanathammanee L, Grisanti L, Watt J, Geiger JD, Liu R, Porter JE, Lei S. GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K⁺ channels. *Neuron* 2009;63:230–43.
- [16] Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, Couette B, Busserolles J, Courteix C, Noel J, Lazdunski M, Eschaliere A, Authier N, Bourin E. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 2011;3:266–78.
- [17] Devilliers M, Busserolles J, Lolignier S, Deval E, Pereira V, Alloui A, Christin M, Mazet B, Delmas P, Noel J, Lazdunski M, Eschaliere A. Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat Commun* 2013;4:2941.
- [18] Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 2008;28:566–75.
- [19] Enyedi P, Cziriak G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 2010;90:559–605.
- [20] Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 1998;17:3297–308.
- [21] Foulkes T, Wood JN. Mechanisms of cold pain. *Channels (Austin)* 2007;1:154–60.
- [22] Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 2010;16:1248–57.
- [23] Guyon A, Tardif MP, Rovere C, Nahon JL, Barhanin J, Lesage F. Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K⁺ channels. *J Neurosci* 2009;29:2528–33.
- [24] Hao J, Padilla F, Dandonneau M, Lavebratt C, Lesage F, Noel J, Delmas P. Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* 2013;77:899–914.
- [25] Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 2004;23:2684–95.
- [26] Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G, Lazdunski M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 2006;9:1134–41.
- [27] Kang D, Choe C, Cavanaugh E, Kim D. Properties of single two-pore domain TREK-2 channels expressed in mammalian cells. *J Physiol* 2007;583:57–69.
- [28] Kang D, Choe C, Kim D. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 2005;564:103–16.
- [29] Kang D, Han J, Kim D. Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C649–56.
- [30] Kang D, Kim D. TREK-2 (K2P10.1) and TREK1 (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C138–46.
- [31] Kirchhoff C, Leah JD, Jung S, Reeh PW. Excitation of cutaneous sensory nerve endings in the rat by 4-aminopyridine and tetraethylammonium. *J Neurophysiol* 1992;67:125–31.
- [32] Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, Chen J, McKemy DD. A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci* 2013;33:2837–48.
- [33] Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 1997;78:1841–50.
- [34] Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2000;275:28398–405.
- [35] Ling B, Coudore-Civiale MA, Balayssac D, Eschaliere A, Coudore F, Authier N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 2007;234:176–84.
- [36] Madrid R, de la Pena E, Donovan-Rodriguez T, Belmonte C, Viana F. Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J Neurosci* 2009;29:3120–31.
- [37] Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem* 1999;274:1381–7.
- [38] Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. TREK-1 is a heat-activated background K⁽⁺⁾ channel. *EMBO J* 2000;19:2483–91.
- [39] Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 1999;274:26691–6.
- [40] Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 2000;275:10128–33.
- [41] Mathie A. Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J Physiol* 2007;578:377–85.
- [42] McCoy DD, Knowlton WM, McKemy DD. Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R1278–87.
- [43] Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, Gloger IL, Pangalos MN. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:101–14.
- [44] Medici C, Barraza G, Castillo CD, Morales M, Schestatsky P, Casanova-Molla J, Valls-Sole J. Disturbed sensory perception of changes in thermoalgesic stimuli in patients with small fiber neuropathies. *PAIN* 2013;154:2100–7.
- [45] Mirkovic K, Palmersheim J, Lesage F, Wickman K. Behavioral characterization of mice lacking TREK channels. *Front Behav Neurosci* 2012;6:60.
- [46] Mishra SK, Tisel SM, Orestes P, Bhargava SK, Hoon MA. TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO J* 2011;30:582–93.
- [47] Mogrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 2005;307:1468–72.
- [48] Murbartian J, Lei Q, Sando JJ, Bayliss DA. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem* 2005;280:30175–84.
- [49] Nilius B, Owlsnik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87:165–217.
- [50] Noel J, Sandoz G, Lesage F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 2011;5:402–9.
- [51] Noel J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschaliere A, Lazdunski M. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 2009;28:1308–18.
- [52] Ohlsson L. Algesimetric studies by the hot plate method in mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1953;9:322–31.
- [53] Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* 1999;2:422–6.
- [54] Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* 1998;17:4283–90.
- [55] Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci* 2013;33:5533–41.
- [56] Reeh PW. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 1986;66:141–6.
- [57] Samad TA, Saperstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med* 2002;8:390–6.
- [58] Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* 2007;27:14147–57.
- [59] Takashima Y, Ma L, McKemy DD. The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience* 2010;169:828–42.
- [60] Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *PAIN* 1994;57:375–82.
- [61] Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 2001;21:7491–505.
- [62] Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci* 2014;37:146–58.
- [63] Tulleud A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X. TREK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* 2011;7:30.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *PAIN[®]* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

ARTICLE IN PRESS

V. Pereira et al./PAIN® xxx (2014) xxx–xxx

11

- [64] Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 2012;165:787–801.
- [65] Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 2011;70:482–94.
- [66] Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer* 2008;44:1507–15.
- [67] Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, Barrot M, Poisbeau P. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain* 2009;10:767–73.
- [68] Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW. Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc* 2009;4:174–96.
- [69] Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:18114–9.
- [70] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *PAIN* 1983;16:109–10.

Please cite this article in press as: Pereira V et al. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *PAIN*® (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.013>

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C.O., Cendan, C.M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J.P., Nassar, M.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321, 702–705.

Acosta, C., Djouhri, L., Watkins, R., Berry, C., Bromage, K., and Lawson, S.N. (2014). TREK2 Expressed Selectively in IB4-Binding C-Fiber Nociceptors Hyperpolarizes Their Membrane Potentials and Limits Spontaneous Pain. *J. Neurosci.* 34, 1494–1509.

Afify, E.A., Khedr, M.M., Omar, A.G., and Nasser, S.A. (2013). The involvement of KATP channels in morphine-induced antinociception and hepatic oxidative stress in acute and inflammatory pain in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27, 623–631.

Akopian, A.N., Sivilotti, L., and Wood, J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257–262.

Akopian, A.N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., Smith, A., Kerr, B.J., McMahon, S.B., Boyce, S., et al. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat. Neurosci.* 2, 541–548.

Akopian, A.N., Chen, C.-C., Ding, Y., Cesare, P., and Wood, J.N. (2000). A new member of the acid-sensing ion channel family. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* July 14 2000 11, 2217–2222.

Alessandri-Haber, N., Yeh, J.J., Boyd, A.E., Parada, C.A., Chen, X., Reichling, D.B., and Levine, J.D. (2003). Hypotonicity Induces TRPV4-Mediated Nociception in Rat. *Neuron* 39, 497–511.

Aller, M.I., and Wisden, W. (2008). Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151, 1154–1172.

Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* 25, 2368–2376.

Amaya, F., Wang, H., Costigan, M., Allchorne, A.J., Hatcher, J.P., Egerton, J., Stean, T., Morisset, V., Grose, D., Gunthorpe, M.J., et al. (2006). The Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.9 Is an Effector of Peripheral Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J. Neurosci.* 26, 12852–12860.

Anand, U., Otto, W.R., Casula, M.A., Day, N.C., Davis, J.B., Bountra, C., Birch, R., and Anand, P. (2006). The effect of neurotrophic factors on morphology, TRPV1 expression and capsaicin responses of cultured human DRG sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 399, 51–56.

Anand, U., Otto, W.R., and Anand, P. (2010). Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol. Pain* 6, 82.

-
- Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S., and Bevan, S. (2008). Transient Receptor Potential A1 Is a Sensory Receptor for Multiple Products of Oxidative Stress. *J. Neurosci.* 28, 2485–2494.
- Andrew, D., and Greenspan, J.D. (1999). Peripheral Coding of Tonic Mechanical Cutaneous Pain: Comparison of Nociceptor Activity in Rat and Human Psychophysics. *J. Neurophysiol.* 82, 2641–2648.
- Asano, T., Dohi, S., and Iida, H. (2000). Antinociceptive Action of Epidural K⁺ATP Channel Openers via Interaction with Morphine and an [α]₂-Adrenergic Agonist in Rats. [Miscellaneous Article]. *Anesth. Analg.* May 2000 90, 1146–1151.
- Attal, N., Bouhassira, D., Gautron, M., Vaillant, J.N., Mitry, E., Lepère, C., Rougier, P., and Guirimand, F. (2009). Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: A prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144, 245–252.
- Babes, A., Zorzon, D., and Reid, G. (2004). Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2276–2282.
- Babes, A., Zorzon, D., and Reid, G. (2006). A novel type of cold-sensitive neuron in rat dorsal root ganglia with rapid adaptation to cooling stimuli. *Eur. J. Neurosci.* 24, 691–698.
- Babes, A., Ciobanu, A.C., Neacsu, C., and Babes, R.-M. (2011). TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve endings. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 78–88.
- Bae, C., Sachs, F., and Gottlieb, P.A. (2011). The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Is Inhibited by the Peptide GsMTx4. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 6295–6300.
- Bagriantsev, S.N., Clark, K.A., and Daniel L Minor, J. (2012). Metabolic and thermal stimuli control K2P2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J.* 31, 3297–3308.
- Bahia, P.K., Suzuki, R., Benton, D.C.H., Jowett, A.J., Chen, M.X., Trezise, D.J., Dickenson, A.H., and Moss, G.W.J. (2005). A Functional Role for Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Sensory Pathways Including Nociceptive Processes. *J. Neurosci.* 25, 3489–3498.
- Baker, M.D., Chandra, S.Y., Ding, Y., Waxman, S.G., and Wood, J.N. (2003). GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones. *J. Physiol.* 548, 373–382.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A. (2004). Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41, 849–857.
- Bang, H., Kim, Y., and Kim, D. (2000). TREK-2, a New Member of the Mechanosensitive Tandem-pore K⁺ Channel Family. *J. Biol. Chem.* 275, 17412–17419.
- Baron, A., Schaefer, L., Lingueglia, E., Champigny, G., and Lazdunski, M. (2001). Zn²⁺ and H⁺ Are Coactivators of Acid-sensing Ion Channels. *J. Biol. Chem.* 276, 35361–35367.
- Baron, A., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (2002a). ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 539, 485–494.

-
- Baron, A., Deval, E., Salinas, M., Lingueglia, E., Voilley, N., and Lazdunski, M. (2002b). Protein Kinase C Stimulates the Acid-sensing Ion Channel ASIC2a via the PDZ Domain-containing Protein PICK1. *J. Biol. Chem.* **277**, 50463–50468.
- Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). Acid Sensing Ion Channels in Dorsal Spinal Cord Neurons. *J. Neurosci.* **28**, 1498–1508.
- Barton, N.J., McQueen, D.S., Thomson, D., Gauldie, S.D., Wilson, A.W., Salter, D.M., and Chessell, I.P. (2006). Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp. Mol. Pathol.* **81**, 166–170.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284.
- Bässler, E.-L., Ngo-Anh, T.J., Geisler, H.-S., Ruppersberg, J.P., and Gründer, S. (2001). Molecular and Functional Characterization of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 1b. *J. Biol. Chem.* **276**, 33782–33787.
- Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Högestätt, E.D., Julius, D., Jordt, S.-E., and Zygmunt, P.M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12248–12252.
- Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* **124**, 1269–1282.
- Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.-E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**, 204–208.
- Behrendt, H.-J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., and Jostock, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 737–745.
- Benson, C.J., Eckert, S.P., and McCleskey, E.W. (1999). Acid-Evoked Currents in Cardiac Sensory Neurons A Possible Mediator of Myocardial Ischemic Sensation. *Circ. Res.* **84**, 921–928.
- Benyamin, R., Trescot, A.M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S.E., and Vallejo, R. (2008). Opioid complications and side effects. *Pain Physician* **11**, S105–S120.
- Berkefeld, H., Fakler, B., and Schulte, U. (2010). Ca²⁺-Activated K⁺ Channels: From Protein Complexes to Function. *Physiol. Rev.* **90**, 1437–1459.
- Berrier, C., Pozza, A., Lavalette, A. de L. de, Chardonnet, S., Mesneau, A., Jaxel, C., Maire, M. le, and Ghazi, A. (2013). The Purified Mechanosensitive Channel TREK-1 Is Directly Sensitive to Membrane Tension. *J. Biol. Chem.* **288**, 27307–27314.
- Bessac, B.F., Sivula, M., von Hehn, C.A., Escalera, J., Cohn, L., and Jordt, S.-E. (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J. Clin. Invest.* **118**, 1899–1910.
-

-
- Bevan, S., and Geppetti, P. (1994). Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci.* 17, 509–512.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., and Zong, X. (2009). Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiol. Rev.* 89, 847–885.
- Bilsky, E.J., Calderon, S.N., Wang, T., Bernstein, R.N., Davis, P., Hruby, V.J., McNutt, R.W., Rothman, R.B., Rice, K.C., and Porreca, F. (1995). SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 359–366.
- Birder, L.A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M.L., Barrick, S., Kanai, A.J., Wang, E., Ruiz, G., de Groat, W.C., Apodaca, G., et al. (2002). Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat. Neurosci.* 5, 856–860.
- Black, J.A., Cummins, T.R., Plumpton, C., Chen, Y.H., Hormuzdiar, W., Clare, J.J., and Waxman, S.G. (1999). Upregulation of a Silent Sodium Channel After Peripheral, but not Central, Nerve Injury in DRG Neurons. *J. Neurophysiol.* 82, 2776–2785.
- Black, J.A., Liu, S., Tanaka, M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2004). Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain* 108, 237–247.
- Blair, N.T., and Bean, B.P. (2003). Role of Tetrodotoxin-Resistant Na⁺ Current Slow Inactivation in Adaptation of Action Potential Firing in Small-Diameter Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurosci.* 23, 10338–10350.
- Blondeau, N., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2002). A Potent Protective Role of Lysophospholipids Against Global Cerebral Ischemia and Glutamate Excitotoxicity in Neuronal Cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 821–834.
- Boettger, M.K., Till, S., Chen, M.X., Anand, U., Otto, W.R., Plumpton, C., Trezise, D.J., Tate, S.N., Bountra, C., Coward, K., et al. (2002). Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors. *Brain* 125, 252–263.
- Borgland, S.L., Connor, M., and Christie, M.J. (2001). Nociceptin inhibits calcium channel currents in a subpopulation of small nociceptive trigeminal ganglion neurons in mouse. *J. Physiol.* 536, 35–47.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., and Zamponi, G.W. (2014). Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. *Physiol. Rev.* 94, 81–140.
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain* 10, 287–287.
- Brohawn, S.G., Mármol, J. del, and MacKinnon, R. (2012). Crystal Structure of the Human K2P TRAAK, a Lipid- and Mechano-Sensitive K⁺ Ion Channel. *Science* 335, 436–441.
- Brohawn, S.G., Su, Z., and MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3614–3619.

-
- Brown, A.G., and Iggo, A. (1967). A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J. Physiol.* 193, 707–733.
- Burgess, P.R., and Perl, E.R. (1967). Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J. Physiol.* 190, 541–562.
- Buxton, I.L.O., Singer, C.A., and Tichenor, J.N. (2010). Expression of Stretch-Activated Two-Pore Potassium Channels in Human Myometrium in Pregnancy and Labor. *PLoS ONE* 5, e12372.
- Cadaveira-Mosquera, A., Ribeiro, S.J., Reboreda, A., Pérez, M., and Lamas, J.A. (2011). Activation of TREK Currents by the Neuroprotective Agent Riluzole in Mouse Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* 31, 1375–1385.
- Cain, S.M., Meadows, H.J., Dunlop, J., and Bushell, T.J. (2008). mGlu4 potentiation of K2P2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 32–39.
- Calvo, R.R., Meegalla, S.K., Parks, D.J., Parsons, W.H., Ballentine, S.K., Lubin, M.L., Schneider, C., Colburn, R.W., Flores, C.M., and Player, M.R. (2012). Discovery of vinylcycloalkyl-substituted benzimidazole TRPM8 antagonists effective in the treatment of cold allodynia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1903–1907.
- Camino, D. del, Murphy, S., Heiry, M., Barrett, L.B., Earley, T.J., Cook, C.A., Petrus, M.J., Zhao, M., D’Amours, M., Deering, N., et al. (2010). TRPA1 Contributes to Cold Hypersensitivity. *J. Neurosci.* 30, 15165–15174.
- Campero, M., Serra, J., Bostock, H., and Ochoa, J.L. (2001). Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J. Physiol.* 535, 855–865.
- Canning, B.J., Farmer, D.G., and Mori, N. (2006). Mechanistic studies of acid-evoked coughing in anesthetized guinea pigs. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R454–R463.
- Cao, X.-H., Byun, H.-S., Chen, S.-R., Cai, Y.-Q., and Pan, H.-L. (2010). Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 114, 1460–1475.
- Caspani, O., and Heppenstall, P.A. (2009). TRPA1 and Cold Transduction: An Unresolved Issue? *J. Gen. Physiol.* 133, 245–249.
- Caterina, M.J., and Julius, D. (2001). THE VANILLOID RECEPTOR: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487–517.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306–313.
-

-
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 397–409.
- Cesare, P., and McNaughton, P. (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 15435–15439.
- Chalfie, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 44–52.
- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2003). Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* 22, 5403–5411.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2005a). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* 24, 44–53.
- Chemin, J., Patel, A., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2005b). Lysophosphatidic Acid-operated K⁺ Channels. *J. Biol. Chem.* 280, 4415–4421.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Sachs, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (2007). Up- and down-regulation of the mechano-gated K2P channel TREK-1 by PIP2 and other membrane phospholipids. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 455, 97–103.
- Chen, C.-C., England, S., Akopian, A.N., and Wood, J.N. (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10240–10245.
- Chen, C.-C., Zimmer, A., Sun, W.-H., Hall, J., Brownstein, M.J., and Zimmer, A. (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8992–8997.
- Chi, X.X., Jiang, X., and Nicol, G.D. (2007). ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE2-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res.* 1145, 28–40.
- Ciura, S., and Bourque, C.W. (2006). Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. *J. Neurosci.* 26, 9069–9075.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
- Coggeshall, R.E., Zhou, S., and Carlton, S.M. (1997). Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.* 764, 126–132.
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S., and Zilberberg, N. (2008). A Novel Mechanism for Human K2P2.1 Channel Gating FACILITATION OF C-TYPE GATING BY PROTONATION OF EXTRACELLULAR HISTIDINE RESIDUES. *J. Biol. Chem.* 283, 19448–19455.
- Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Jr, Wang, Y., Lawrence, D., D’Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379–386.

-
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science* 330, 55–60.
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., et al. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483, 176–181.
- Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444, 894–898.
- Craner, M.J., Klein, J.P., Renganathan, M., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2002). Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* 52, 786–792.
- Cruz, H.G., Berton, F., Sollini, M., Blanchet, C., Pravetoni, M., Wickman, K., and Lüscher, C. (2008). Absence and rescue of morphine withdrawal in GIRK/Kir3 knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4069–4077.
- Cummins, T.R., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Akopian, A.N., Wood, J.N., and Waxman, S.G. (1999). A Novel Persistent Tetrodotoxin-Resistant Sodium Current In SNS-Null And Wild-Type Small Primary Sensory Neurons. *J. Neurosci.* 19, RC43–RC43.
- Cummins, T.R., Sheets, P.L., and Waxman, S.G. (2007). The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *PAIN* 131, 243–257.
- Darian-Smith, I., Johnson, K.O., and Dykes, R. (1973). “Cold” fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J. Neurophysiol.* 36, 325–346.
- Darian-Smith, I., Johnson, K.O., LaMotte, C., Shigenaga, Y., Kenins, P., and Champness, P. (1979). Warm fibers innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to thermal stimuli. *J. Neurophysiol.* 42, 1297–1315.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183–187.
- Delaunay, A., Gasull, X., Salinas, M., Noël, J., Friend, V., Lingueglia, E., and Deval, E. (2012). Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13124–13129.
- Delmas, P., and Coste, B. (2013). Mechano-Gated Ion Channels in Sensory Systems. *Cell* 155, 278–284.
- Delmas, P., Hao, J., and Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 139–153.

-
- Deng, P.-Y., Xiao, Z., Yang, C., Rojanathammanee, L., Grisanti, L., Watt, J., Geiger, J.D., Liu, R., Porter, J.E., and Lei, S. (2009). GABAB Receptor Activation Inhibits Neuronal Excitability and Spatial Learning in the Entorhinal Cortex by Activating TREK-2 K⁺ Channels. *Neuron* 63, 230–243.
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 3, 266–278.
- Deval, E., Baron, A., Lingueglia, E., Mazarguil, H., Zajac, J.-M., and Lazdunski, M. (2003). Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 44, 662–671.
- Deval, E., Salinas, M., Baron, A., Lingueglia, E., and Lazdunski, M. (2004). ASIC2b-dependent Regulation of ASIC3, an Essential Acid-sensing Ion Channel Subunit in Sensory Neurons via the Partner Protein PICK-1. *J. Biol. Chem.* 279, 19531–19539.
- Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008). ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.* 27, 3047–3055.
- Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2011). Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain. *J. Neurosci.* 31, 6059–6066.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lolignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., Christin, M., Mazet, B., Delmas, P., Noel, J., et al. (2013). Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 4.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 135–161.
- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54, 371–378.
- Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., and Patapoutian, A. (2008). Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections. *J. Neurosci.* 28, 566–575.
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552–555.
- Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004). A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Rev.* 46, 131–145.
- Djoughri, L., Bleazard, L., and Lawson, S.N. (1998). Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 513, 857–872.

- Djoughri, L., Newton, R., Levinson, S.R., Berry, C.M., Carruthers, B., and Lawson, S.N. (2003). Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na⁺ channel α subunit protein. *J. Physiol.* 546, 565–576.
- Donier, E., Rugiero, F., Jacob, C., and Wood, J.N. (2008). Regulation of ASIC activity by ASIC4 – new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *Eur. J. Neurosci.* 28, 74–86.
- DRESS (2008). Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des Statistiques : Douleurs chroniques. In *L'état de Santé de La Population En France-Indicateurs Associés À La Loi Relative À La Politique de Santé Publique. Rapport 2007*, pp. 142–143.
- Du, X., Wang, C., and Zhang, H. (2011). Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. *Mol. Pain* 7, 35.
- Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., and Xu, T.-L. (2007). Upregulation of Acid-Sensing Ion Channel ASIC1a in Spinal Dorsal Horn Neurons Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J. Neurosci.* 27, 11139–11148.
- Dubé, G.R., Lehto, S.G., Breese, N.M., Baker, S.J., Wang, X., Matulenko, M.A., Honoré, P., Stewart, A.O., Moreland, R.B., and Brioni, J.D. (2005). Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* 117, 88–96.
- Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760–3772.
- Dubin, A.E., Schmidt, M., Mathur, J., Petrus, M.J., Xiao, B., Coste, B., and Patapoutian, A. (2012). Inflammatory Signals Enhance Piezo2-Mediated Mechanosensitive Currents. *Cell Rep.* 2, 511–517.
- Dubner, R., and Bennett, G.J. (1983). Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 381–418.
- Dubner, R., Sumino, R., and Wood, W.I. (1975). A peripheral “cold” fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey’s face. *J. Neurophysiol.* 38, 1373–1389.
- Duclaux, R., and Kenshalo, D.R. (1980). Response characteristics of cutaneous warm receptors in the monkey. *J. Neurophysiol.* 43, 1–15.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57, 906–912.
- Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Torres, J.M., Bee, L., Dickenson, A.H., Gringhuis, M., Minett, M.S., Hong, G.S., Lee, E., Oh, U., et al. (2013). A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nat. Commun.* 4, 1682.
- Emery, E.C., Young, G.T., Berrocoso, E.M., Chen, L., and McNaughton, P.A. (2011). HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain. *Science* 333, 1462–1466.

-
- Enyeart, J.J., Danthi, S.J., Liu, H., and Enyeart, J.A. (2005). Angiotensin II Inhibits bTREK-1 K⁺ Channels in Adrenocortical Cells by Separate Ca²⁺- and ATP Hydrolysis-dependent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* *280*, 30814–30828.
- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* *90*, 559–605.
- Faber, C.G., Lauria, G., Merckes, I.S.J., Cheng, X., Han, C., Ahn, H.-S., Persson, A.-K., Hoeijmakers, J.G.J., Gerrits, M.M., Pierro, T., et al. (2012). Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 19444–19449.
- Faucherre, A., Nargeot, J., Mangoni, M.E., and Jopling, C. (2013). piezo2b Regulates Vertebrate Light Touch Response. *J. Neurosci.* *33*, 17089–17094.
- Fertleman, C.R., Baker, M.D., Parker, K.A., Moffatt, S., Elmslie, F.V., Abrahamsen, B., Ostman, J., Klugbauer, N., Wood, J.N., Gardiner, R.M., et al. (2006). SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes. *Neuron* *52*, 767–774.
- Fields, H.L., Emson, P.C., Leigh, B.K., Gilbert, R.F., and Iversen, L.L. (1980). Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* *284*, 351–353.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* *15*, 6854–6862.
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* *17*, 3297–3308.
- Foulkes, T., and Wood, J. (2007). Mechanisms of Cold Pain. *Channels* *1*, 154–160.
- Franks, N.P., and Honoré, E. (2004). The TREK K₂P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 601–608.
- Frederick, J., Buck, M.E., Matson, D.J., and Cortright, D.N. (2007). Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *358*, 1058–1064.
- Gao, J., Duan, B., Wang, D.-G., Deng, X.-H., Zhang, G.-Y., Xu, L., and Xu, T.-L. (2005). Coupling between NMDA Receptor and Acid-Sensing Ion Channel Contributes to Ischemic Neuronal Death. *Neuron* *48*, 635–646.
- García-Añoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., and Corey, D.P. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 1459–1464.
- García-Añoveros, J., Samad, T.A., Žuvela-Jelaska, L., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2001). Transport and Localization of the DEG/ENaC Ion Channel BNaC1 α to Peripheral Mechanosensory Terminals of Dorsal Root Ganglia Neurons. *J. Neurosci.* *21*, 2678–2686.

-
- Gardener, M.J., Johnson, I.T., Burnham, M.P., Edwards, G., Heagerty, A.M., and Weston, A.H. (2004). Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 192–202.
- Gasser, H.S. (1941). The Classification of Nerve Fibers. *Ohio J. Sci.* **41**.
- Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A., and Kuraishi, Y. (2009). Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci. Lett.* **458**, 93–95.
- Gaveriaux-Ruff, C., Nozaki, C., Nadal, X., Hever, X.C., Weibel, R., Matifas, A., Reiss, D., Filliol, D., Nassar, M.A., Wood, J.N., et al. (2011). Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *PAIN* **152**, 1238–1248.
- Gerke, M.B., and Plenderleith, M.B. (2001). Binding sites for the plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-isolectin B4 are expressed by nociceptive primary sensory neurones. *Brain Res.* **911**, 101–104.
- Gielen, M. (2010). Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate: Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *Médecine/sciences* **26**, 65–72.
- Glaum, S.R., Miller, R.J., and Hammond, D.L. (1994). Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 4965–4971.
- Gnatenco, C., Han, J., Snyder, A.K., and Kim, D. (2002). Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res.* **931**, 56–67.
- Gold, M.S., and Levine, J.D. (1996). DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* **212**, 83–86.
- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., and Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 527–540.
- Gonzales, E.B., Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* **460**, 599–604.
- Goonetilleke, L., and Quayle, J. (2012). TREK-1 K⁺ Channels in the Cardiovascular System: Their Significance and Potential as a Therapeutic Target. *Cardiovasc. Ther.* **30**, e23–e29.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003). Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-related Cation Channel TRPM3. *J. Biol. Chem.* **278**, 21493–21501.
- Grudt, T.J., and Williams, J.T. (1994). mu-Opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea pig and rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 1646–1654.

-
- Grunder, S., Geissler, H.-S., Bassler, E.-L., and Ruppersberg, J.P. (2000). A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* June 5 2000 *11*, 1607–1611.
- Gruss, M., Bushell, T.J., Bright, D.P., Lieb, W.R., Mathie, A., and Franks, N.P. (2004). Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol.* *65*, 443–452.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* *260*, 3440–3450.
- Gu, W., Schlichthörl, G., Hirsch, J.R., Engels, H., Karschin, C., Karschin, A., Derst, C., Steinlein, O.K., and Daut, J. (2002). Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. *J. Physiol.* *539*, 657–668.
- Gu, Y., Barry, J., McDougel, R., Terman, D., and Gu, C. (2012). Alternative Splicing Regulates Kv3.1 Polarized Targeting to Adjust Maximal Spiking Frequency. *J. Biol. Chem.* *287*, 1755–1769.
- Guirimand, F., and Le Bars, D. (1996). Physiologie de la nociception. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* *15*, 1048–1079.
- Güler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *J. Neurosci.* *22*, 6408–6414.
- Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Prinjha, R.K., Davis, J.B., and Randall, A. (2000). Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J. Physiol.* *525*, 747–759.
- Guyon, A., Tardy, M.P., Rovère, C., Nahon, J.-L., Barhanin, J., and Lesage, F. (2009). Glucose Inhibition Persists in Hypothalamic Neurons Lacking Tandem-Pore K⁺ Channels. *J. Neurosci.* *29*, 2528–2533.
- Hains, B.C., Saab, C.Y., Klein, J.P., Craner, M.J., and Waxman, S.G. (2004). Altered Sodium Channel Expression in Second-Order Spinal Sensory Neurons Contributes to Pain after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* *24*, 4832–4839.
- Haist, F., Bowden Gore, J., and Mao, H. (2001). Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nat. Neurosci.* *4*, 1139–1145.
- Dib-Hajj, S.D., Tyrrell, L., Black, J.A., and Waxman, S.G. (1998). Na_v1, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 8963–8968.
- Dib-Hajj, S.D., Tyrrell, L., Cummins, T.R., Black, J.A., Wood, P.M., and Waxman, S.G. (1999). Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett.* *462*, 117–120.
- Dib-Hajj, S.D., Rush, A.M., Cummins, T.R., Hisama, F.M., Novella, S., Tyrrell, L., Marshall, L., and Waxman, S.G. (2005). Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* *128*, 1847–1854.

- Dib-Hajj, S.D., Cummins, T.R., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2010). Sodium Channels in Normal and Pathological Pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 325–347.
- Dib-Hajj, S.D., Yang, Y., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2013). The Nav1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 49–62.
- Dib-Hajj, S., Black, J.A., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2002). NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci.* 25, 253–259.
- Hamill, O.P., and Martinac, B. (2001). Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells. *Physiol. Rev.* 81, 685–740.
- Han, J., Truell, J., Gnatenco, C., and Kim, D. (2002). Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 542, 431–444.
- Hao, J., Padilla, F., Dandonneau, M., Lavebratt, C., Lesage, F., Noël, J., and Delmas, P. (2013). Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* 77, 899–914.
- Heinke, B., Gingl, E., and Sandkühler, J. (2011). Multiple Targets of μ -Opioid Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition at Primary Afferent A δ - and C-Fibers. *J. Neurosci.* 31, 1313–1322.
- Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Gray, C.W., Green, P.J., Ranson, J.L., Randall, A.D., and Meadows, H.J. (2001). Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 103, 899–919.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* 23, 2684–2695.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmel, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., et al. (2006). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* 9, 1134–1141.
- Hirning, L.D., Mosberg, H.I., Hurst, R., Hruby, V.J., Burks, T.F., and Porreca, F. (1985). Studies in vitro with ICI 174,864, [D-Pen², D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) and [D-Ala², NMePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin (DAGO). *Neuropeptides* 5, 383–386.
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 251–261.
- Honoré, E., Maingret, F., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2002). An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* 21, 2968–2976.
- Honoré, E., Patel, A.J., Chemin, J., Suchyna, T., and Sachs, F. (2006). Desensitization of mechano-gated K2P channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6859–6864.
- Hruska-Hageman, A.M., Wemmie, J.A., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2002). Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel). *Biochem. J.* 361, 443–450.

-
- Hruska-Hageman, A.M., Benson, C.J., Leonard, A.S., Price, M.P., and Welsh, M.J. (2004). PSD-95 and Lin-7b Interact with Acid-sensing Ion Channel-3 and Have Opposite Effects on H⁺-gated Current. *J. Biol. Chem.* 279, 46962–46968.
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J.G.J., Gerrits, M.M., Tyrrell, L., Lauria, G., Faber, C.G., Dib-Hajj, S.D., et al. (2014). Gain-of-function mutations in sodium channel Nav1.9 in painful neuropathy. *Brain* 137, 1627–1642.
- Iggo, A., and Andres, K.H. (1982). Morphology of cutaneous receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 5, 1–31.
- Iggo, A., and Kornhuber, H.H. (1977). A quantitative study of C-mechanoreceptors in hairy skin of the cat. *J. Physiol.* 271, 549–565.
- Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M.L., Campbell, A., and Caterina, M. (2005). Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci. Lett.* 378, 28–33.
- Ikeda, K., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Niki, H., and Yano, R. (2000). Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia. *Neurosci. Res.* 38, 113–116.
- Ikeuchi, M., Kolker, S.J., Burnes, L.A., Walder, R.Y., and Sluka, K.A. (2008). Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* 137, 662–669.
- Ishikawa, K., Tanaka, M., Black, J.A., and Waxman, S.G. (1999). Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* 22, 502–507.
- Issberner, U., Reeh, P.W., and Steen, K.H. (1996). Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neurosci. Lett.* 208, 191–194.
- Jarvis, M.F., Honore, P., Shieh, C.-C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X.-F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., et al. (2007). A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 8520–8525.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316–323.
- Jones, N.G., Slater, R., Cadiou, H., McNaughton, P., and McMahon, S.B. (2004). Acid-Induced Pain and Its Modulation in Humans. *J. Neurosci.* 24, 10974–10979.
- Jones, R.C.W., Xu, L., and Gebhart, G.F. (2005). The Mechanosensitivity of Mouse Colon Afferent Fibers and Their Sensitization by Inflammatory Mediators Require Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Acid-Sensing Ion Channel 3. *J. Neurosci.* 25, 10981–10989.
- Jordt, S.-E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8134–8139.

- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265.
- Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
- Kanai, Y., Hara, T., Imai, A., and Sakakibara, A. (2007). Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 733–738.
- Kandel, E., and Schwartz, J. (2013). *Principles of Neural Science, Fifth Edition* (McGraw Hill Professional).
- Kang, D., and Kim, D. (2006). TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C138–C146.
- Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* 564, 103–116.
- Kang, D., Han, J., and Kim, D. (2006). Mechanism of inhibition of TREK-2 (K2P10.1) by the Gq-coupled M3 muscarinic receptor. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 291, C649–C656.
- Kang, Y.-M., Zhang, Z.-H., Yang, S.-W., Qiao, J.-T., and Dafny, N. (1998). ATP-Sensitive K Channels are Involved in the Mediation of Intrathecal Norepinephrine- or Morphine-Induced Antinociception at the Spinal Level: A Study Using EMG Planimetry of Flexor Reflex in Rats. *Brain Res. Bull.* 45, 269–273.
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., and Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1273–1278.
- Kawano, T., Zoga, V., Gemes, G., McCallum, J.B., Wu, H.-E., Pravdic, D., Liang, M.-Y., Kwok, W.-M., Hogan, Q., and Sarantopoulos, C. (2009). Suppressed Ca²⁺/CaM/CaMKII-dependent KATP channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8725–8730.
- Kawashiri, T., Egashira, N., Kurobe, K., Tsutsumi, K., Yamashita, Y., Ushio, S., Yano, T., and Oishi, R. (2012). L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain* 8, 7.
- Kellenberger, S., and Schild, L. (2002). Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of Ion Channels: A Variety of Functions for a Shared Structure. *Physiol. Rev.* 82, 735–767.
- Kelly, D., Mackenzie, L., Hunter, P., Smail, B., and Saint, D. (2006). Gene Expression of Stretch-Activated Channels and Mechanoelectric Feedback in the Heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 642–648.

-
- Kennard, L.E., Chumbley, J.R., Ranatunga, K.M., Armstrong, S.J., Veale, E.L., and Mathie, A. (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* *144*, 821–829.
- Kenshalo, D.R., and Duclaux, R. (1977). Response characteristics of cutaneous cold receptors in the monkey. *J. Neurophysiol.* *40*, 319–332.
- Kerr, B.J., Souslova, V., McMahon, S.B., and Wood, J.N. 2 (2001). A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* Oct. 8 2001 *12*, 3077–3080.
- Kieffer, B.L., and Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* *66*, 285–306.
- Kim, D. (2005). Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 2717–2736.
- Kim, E., Hwang, E.M., Yarishkin, O., Yoo, J.C., Kim, D., Park, N., Cho, M., Lee, Y.S., Sun, C.-H., Yi, G.-S., et al. (2010). Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein–protein interaction with β -COP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *395*, 244–250.
- Kim, J.-S., Park, J.-Y., Kang, H.-W., Lee, E.-J., Bang, H., and Lee, J.-H. (2005). Zinc Activates TREK-2 Potassium Channel Activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 618–625.
- Kim, S.E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B., and Patapoutian, A. (2012). The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception. *Nature* *483*, 209–212.
- Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., and Kim, D. (2001). Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflüg. Arch.* *442*, 64–72.
- Kirschstein, T., Büsselberg, D., and Treede, R.-D. (1997). Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* *231*, 33–36.
- Kirschstein, T., Greffrath, W., Büsselberg, D., and Treede, R.-D. (1999). Inhibition of Rapid Heat Responses in Nociceptive Primary Sensory Neurons of Rats by Vanilloid Receptor Antagonists. *J. Neurophysiol.* *82*, 2853–2860.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1995). Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J.* *14*, 1084.
- Knowlton, W.M., Bifolck-Fisher, A., Bautista, D.M., and McKemy, D.D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* *150*, 340–350.
- Knowlton, W.M., Palkar, R., Lippoldt, E.K., McCoy, D.D., Baluch, F., Chen, J., and McKemy, D.D. (2013). A Sensory-Labeled Line for Cold: TRPM8-Expressing Sensory Neurons Define the Cellular Basis for Cold, Cold Pain, and Cooling-Mediated Analgesia. *J. Neurosci.* *33*, 2837–2848.

-
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with a δ /c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 493, 596–606.
- Kollarik, M., and Undem, B.J. (2002). Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *J. Physiol.* 543, 591–600.
- Koltzenburg, M., Stucky, C.L., and Lewin, G.R. (1997). Receptive Properties of Mouse Sensory Neurons Innervating Hairy Skin. *J. Neurophysiol.* 78, 1841–1850.
- Kucheryavykh, L.Y., Kucheryavykh, Y.V., Inyushin, M., Shuba, Y.M., Sanabria, P., Cubano, L.A., Skatchkov, S.N., and Eaton, M.J. (2009). Ischemia Increases TREK-2 Channel Expression in Astrocytes: Relevance to Glutamate Clearance. *Open Neurosci. J.* 3, 40–47.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* 50, 277–289.
- Lai, J., Gold, M.S., Kim, C.-S., Biana, D., Ossipov, M.H., Hunterc, J.C., and Porreca, F. (2002). Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. *Pain* 95, 143–152.
- Laigle, C., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Cozzone, P.J., and Viola, A. (2012). Deletion of TRAAK Potassium Channel Affects Brain Metabolism and Protects against Ischemia. *PLoS ONE* 7, e53266.
- LaMotte, R.H., and Campbell, J.N. (1978). Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain. *J. Neurophysiol.* 41, 509–528.
- LaMotte, R.H., and Thalhammer, J.G. (1982). Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res.* 244, 279–287.
- Lang-Lazdunski, L., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2003). Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. *J. Vasc. Surg.* 38, 564–575.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* 19, 1784–1793.
- Lauritzen, I., Chemin, J., Honoré, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2005). Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* 6, 642–648.
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M.J. (2005). Altered Thermal Selection Behavior in Mice Lacking Transient Receptor Potential Vanilloid 4. *J. Neurosci.* 25, 1304–1310.
- Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G.C., Heinrich, T., Gießelmann, S., Baets, J., Ebbinghaus, M., Goral, R.O., Stöckberg, T., Hennings, J.C., et al. (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nat. Genet.* 45, 1399–1404.
-

-
- Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 279, F793–F801.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.* 15, 6400–6407.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000a). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 28398–28405.
- Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000b). Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett.* 471, 137–140.
- Lewin, G.R., and Moshourab, R. (2004). Mechanosensation and pain. *J. Neurobiol.* 61, 30–44.
- Lewinter, R.D., Skinner, K., Julius, D., and Basbaum, A.I. (2004). Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 470, 400–408.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The Functional Organization of Cutaneous Low-Threshold Mechanosensory Neurons. *Cell* 147, 1615–1627.
- Li, W., Gao, S.-B., Lv, C.-X., Wu, Y., Guo, Z.-H., Ding, J.-P., and Xu, T. (2007). Characterization of voltage-and Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Cell. Physiol.* 212, 348–357.
- Li, X.T., Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Müller, R., Isenberg, G., and Daut, J. (2006). The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc. Res.* 69, 86–97.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112.
- Liedtke, W., and Friedman, J.M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13698–13703.
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Andrejčali, Hudspeth, A.J., Friedman, J.M., and Heller, S. (2000). Vanilloid Receptor–Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* 103, 525–535.
- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing Ion Channels in Sensory Perception. *J. Biol. Chem.* 282, 17325–17329.
- Lingueglia, E., Weille, J.R. de, Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1997). A Modulatory Subunit of Acid Sensing Ion Channels in Brain and Dorsal Root Ganglion Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29778–29783.
-

-
- Lohmann, A.B., and Welch, S.P. (1999). ATP-gated K⁺ channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. *Eur. J. Pharmacol.* **385**, 119–127.
- Löken, L.S., Wessberg, J., Morrison, I., McGlone, F., and Olausson, H. (2009). Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat. Neurosci.* **12**, 547–548.
- Lolignier, S., Amsalem, M., Maingret, F., Padilla, F., Gabriac, M., Chapuy, E., Eschalier, A., Delmas, P., and Busserolles, J. (2011). Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation. *PLoS ONE* **6**, e23083.
- Lopes, C.M.B., Rohács, T., Czirják, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D.E. (2005). PIP₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J. Physiol.* **564**, 117–129.
- Lüscher, C., and Slesinger, P.A. (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 301–315.
- Ma, Q.-P. (2001). Vanilloid receptor homologue, VRL1, is expressed by both A- and C-fiber sensory neurons. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* Dec. 4 2001 **12**, 3693–3695.
- Mackenzie, R.A., Burke, D., Skuse, N.F., and Lethlean, A.K. (1975). Fibre function and perception during cutaneous nerve block. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **38**, 865–873.
- Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., and Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541–545.
- Madrid, R., Peña, E. de la, Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Variable Threshold of Trigeminal Cold-Thermosensitive Neurons Is Determined by a Balance between TRPM8 and Kv1 Potassium Channels. *J. Neurosci.* **29**, 3120–3131.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (1999a). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 26691–26696.
- Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (1999b). TRAAK Is a Mammalian Neuronal Mechano-gated K⁺Channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 1381–1387.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000a). TREK-1 is a heat-activated background K⁽⁺⁾ channel. *EMBO J.* **19**, 2483–2491.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000b). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* **275**, 10128–10133.
- Maingret, F., Honoré, E., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2002). Molecular Basis of the Voltage-Dependent Gating of TREK-1, a Mechano-Sensitive K⁺ Channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 339–346.
-

- Mamet, J., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2003). How Nerve Growth Factor Drives Physiological and Inflammatory Expressions of Acid-sensing Ion Channel 3 in Sensory Neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 48907–48913.
- Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18, 22–29.
- Marker, C.L., Cintora, S.C., Roman, M.I., Stoffel, M., and Wickman, K. (2002). Hyperalgesia and blunted morphine analgesia in G protein-gated potassium channel subunit knockout mice. *Neuroreport* 13, 2509–2513.
- Marker, C.L., Stoffel, M., and Wickman, K. (2004). Spinal G-Protein-Gated K⁺ Channels Formed by GIRK1 and GIRK2 Subunits Modulate Thermal Nociception and Contribute to Morphine Analgesia. *J. Neurosci.* 24, 2806–2812.
- Marker, C.L., Luján, R., Loh, H.H., and Wickman, K. (2005). Spinal G-Protein-Gated Potassium Channels Contribute in a Dose-Dependent Manner to the Analgesic Effect of μ - and δ - But Not κ -Opioids. *J. Neurosci.* 25, 3551–3559.
- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., Zieglgänsberger, W., Landgraf, R., Lutz, B., and Wotjak, C.T. (2007). Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 27, 832–839.
- Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S.N. (2012). Leak K⁺ channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 375–386.
- Mathie, A. (2007). Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J. Physiol.* 578, 377–385.
- Mathie, A., Rees, K.A., El Hachmane, M.F., and Veale, E.L. (2010). Trafficking of neuronal two pore domain potassium channels. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 276–286.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823.
- Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., et al. (2010). Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biol* 8, e1000355.
- Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélout, A., Cupo, A., et al. (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* 10, 943–945.
- McCarter, G.C., Reichling, D.B., and Levine, J.D. (1999). Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 273, 179–182.

-
- McCoy, D.D., Knowlton, W.M., and McKemy, D.D. (2011). Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R1278–R1287.
- McGlone, F., and Reilly, D. (2010). The cutaneous sensory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 148–159.
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58.
- Meadows, H.J., Benham, C.D., Cairns, W., Gloger, I., Jennings, C., Medhurst, A.D., Murdock, P., and Chapman, C.G. (2000). Cloning, localisation and functional expression of the human orthologue of the TREK-1 potassium channel. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 439, 714–722.
- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kelsell, R.E., Gloger, I.I., and Pangalos, M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86, 101–114.
- Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–979.
- Meyer, R.A., Davis, K.D., Cohen, R.H., Treede, R.-D., and Campbell, J.N. (1991). Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. *Brain Res.* 561, 252–261.
- Mick, G., Perrot, S., Poulain, P., Serrie, A., Eschali r, A., Langley, P., Pomerantz, D., and Ganry, H. (2013). Impact soci tal de la douleur en France : r sultats de l’enqu te  pid miologique National Health and Wellness Survey aupr s de plus de 15 000 personnes adultes. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* 14, 57–66.
- Mi Hwang, E., Kim, E., Yarishkin, O., Ho Woo, D., Han, K.-S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., et al. (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat. Commun.* 5.
- Miller, A.N., and Long, S.B. (2012). Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1. *Science* 335, 432–436.
- Minami, M., Maekawa, K., Yabuuchi, K., and Satoh, M. (1995). Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30, 203–210.
- Minett, M.S., Falk, S., Santana-Varela, S., Bogdanov, Y.D., Nassar, M.A., Heegaard, A.-M., and Wood, J.N. (2014). Pain without Nociceptors? Nav1.7-Independent Pain Mechanisms. *Cell Rep.* 6, 301–312.
- Mirkovic, K., and Wickman, K. (2011). Identification and characterization of alternative splice variants of the mouse *Trek2/Kcnk10* gene. *Neuroscience* 194, 11–18.
- Mirkovic, K., Palmersheim, J., Lesage, F., and Wickman, K. (2012). Behavioral characterization of mice lacking *Trek* channels. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 60.

-
- Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2010). Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 157–163.
- Mishra, S.K., Tisel, S.M., Orestes, P., Bhangoo, S.K., and Hoon, M.A. (2011). TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO J.* 30, 582–593.
- Mitchell, K., Bates, B.D., Keller, J.M., Lopez, M., Scholl, L., Navarro, J., Madian, N., Haspel, G., Nemenov, M.I., and Iadarola, M.J. (2010). Ablation of rat TRPV1-expressing Adelta/C-fibers with resiniferatoxin: analysis of withdrawal behaviors, recovery of function and molecular correlates. *Mol. Pain* 6, 94.
- Mitrovic, I., Margeta-Mitrovic, M., Bader, S., Stoffel, M., Jan, L.Y., and Basbaum, A.I. (2003). Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 271–276.
- Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M., and Suzuki, M. (2003). Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 285, C96–C101.
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., and McNaughton, P.A. (2008). Role of the hyperpolarization-activated current Ih in somatosensory neurons. *J. Physiol.* 586, 5911–5929.
- Monaghan, K., Baker, S.A., Dwyer, L., Hatton, W.C., Park, K.S., Sanders, K.M., and Koh, S.D. (2011). The stretch-dependent potassium channel TREK-1 and its function in murine myometrium. *J. Physiol.* 589, 1221–1233.
- Mongan, L.C., Hill, M.J., Chen, M.X., Tate, S.N., Collins, S.D., Buckby, L., and Grubb, B.D. (2005). The distribution of small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels in the rat sensory nervous system. *Neuroscience* 131, 161–175.
- Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313–1323.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science* 307, 1468–1472.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and Viana, F. (2014). Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Rep.* 8, 1571–1582.
- Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., and Tominaga, M. (2005). Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain* 1, 3.
- Mousa, S.A., Zhang, Q., Sitte, N., Ji, R., and Stein, C. (2001). beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J. Neuroimmunol.* 115, 71–78.
- Müller, J.P. (1840). *Handbuch der Physiologie des Menschen: für Vorlesungen*. Bd. 2 (J. Hölscher).
-

-
- Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., and Imaizumi, Y. (2003). TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes. *Circ. Res.* *93*, 829–838.
- Murbartíán, J., Lei, Q., Sando, J.J., and Bayliss, D.A. (2005). Sequential Phosphorylation Mediates Receptor- and Kinase-induced Inhibition of TREK-1 Background Potassium Channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 30175–30184.
- Nagy, I., and Rang, H. (1999a). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* *88*, 995–997.
- Nagy, I., and Rang, H.P. (1999b). Similarities and Differences between the Responses of Rat Sensory Neurons to Noxious Heat and Capsaicin. *J. Neurosci.* *19*, 10647–10655.
- Narita, M., Suzuki, T., Misawa, M., Nagase, H., Nabeshima, A., Ashizawa, T., Ozawa, H., Saito, T., and Takahata, N. (1992). Role of central ATP-sensitive potassium channels in the analgesic effect and spinal noradrenaline turnover-enhancing effect of intracerebroventricularly injected morphine in mice. *Brain Res.* *596*, 209–214.
- Narita, M., Takamori, K., Kawashima, N., Funada, M., Kamei, J., Suzuki, T., Misawa, M., and Nagase, H. (1993). Activation of central ATP-sensitive potassium channels produces the antinociception and spinal noradrenaline turnover-enhancing effect in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *113*, 11–14.
- Nassar, M.A., Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., and Wood, J.N. (2004). Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12706–12711.
- Nassar, M.A., Levato, A., Stirling, L.C., and Wood, J.N. (2005). Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol. Pain* *1*, 24.
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., et al. (2011). Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN®* *152*, 1621–1631.
- Nativi, C., Gualdani, R., Dragoni, E., Di Cesare Mannelli, L., Sostegni, S., Norcini, M., Gabrielli, G., la Marca, G., Richichi, B., Francesconi, O., et al. (2013). A TRPA1 antagonist reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Sci. Rep.* *3*.
- Nayak, T.K., Harinath, S., Nama, S., Somasundaram, K., and Sikdar, S.K. (2009). Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol. Pharmacol.* *76*, 903–917.
- Nedungadi, T.P., Dutta, M., Bathina, C.S., Caterina, M.J., and Cunningham, J.T. (2012). Expression and distribution of TRPV2 in rat brain. *Exp. Neurol.* *237*, 223–237.
- Neumann, S., Braz, J.M., Skinner, K., Llewellyn-Smith, I.J., and Basbaum, A.I. (2008). Innocuous, Not Noxious, Input Activates PKC γ Interneurons of the Spinal Dorsal Horn via Myelinated Afferent Fibers. *J. Neurosci.* *28*, 7936–7944.
-

- Nilius, B., and Voets, T. (2013). The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep.* 14, 152–163.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J.A. (2007). Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol. Rev.* 87, 165–217.
- Nockemann, D., Rouault, M., Labuz, D., Hublitz, P., McKnelly, K., Reis, F.C., Stein, C., and Heppenstall, P.A. (2013). The K⁺ channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. *EMBO Mol. Med.* 5, 1263–1277.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., et al. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28, 1308–1318.
- Noël, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels* 5, 402–409.
- Ocaña, M., Del Pozo, E., Barrios, M., Robles, L.I., and Baeyens, J.M. (1990). An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 377–378.
- Ocaña, M., Cendán, C.M., Cobos, E.J., Entrena, J.M., and Baeyens, J.M. (2004). Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 203–219.
- O’Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A.N. (2002). Forward Transport: 14-3-3 Binding Overcomes Retention in Endoplasmic Reticulum by Dibasic Signals. *Cell* 111, 577–588.
- Östman, J.A.R., Nassar, M.A., Wood, J.N., and Baker, M.D. (2008). GTP up-regulated persistent Na⁺ current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9. *J. Physiol.* 586, 1077–1087.
- Ozaita, A., and Vega-Saenz de Miera, E. (2002). Cloning of two transcripts, HKT4.1a and HKT4.1b, from the human two-pore K⁺ channel gene KCNK4: Chromosomal localization, tissue distribution and functional expression. *Mol. Brain Res.* 102, 18–27.
- Pacheco, D. da F., Pacheco, C.M. da F., and Duarte, I.D.G. (2012a). δ -Opioid receptor agonist SNC80 induces central antinociception mediated by Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1084–1089.
- Pacheco, D. da F., Pacheco, C.M. da F., and Duarte, I.D.G. (2012b). Peripheral antinociception induced by δ -opioid receptors activation, but not μ - or κ -, is mediated by Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Eur. J. Pharmacol.* 674, 255–259.
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Martinez-Salgado, C., Wemmie, J.A., Brennan, T.J., Symonds, E., Omari, T., Lewin, G.R., Welsh, M.J., et al. (2004). The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous mechanoreceptor function. *Gastroenterology* 127, 1739–1747.
- Paré, M., Elde, R., Mazurkiewicz, J.E., Smith, A.M., and Rice, F.L. (2001). The Meissner corpuscle revised: a multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7236–7246.

-
- Park, K.-S., Han, M.H., Jang, H.K., Kim, K.-A., Cha, E.-J., Kim, W.-J., Choi, Y.H., and Kim, Y. (2013). The TREK2 Channel Is Involved in the Proliferation of 253J Cell, a Human Bladder Carcinoma Cell. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* *17*, 511.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., and Caterina, M.J. (2011). TRP Vanilloid 2 Knock-Out Mice Are Susceptible to Perinatal Lethality But Display Normal Thermal and Mechanical Nociception. *J. Neurosci.* *31*, 11425–11436.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 529–539.
- Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C.J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 55–68.
- Patel, A.J., and Honoré, E. (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* *24*, 339–346.
- Patel, A.J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* *17*, 4283–4290.
- Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* *2*, 422–426.
- Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 422–428.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., et al. (2002a). A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* *296*, 2046–2049.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002b). A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* *108*, 705–715.
- Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., et al. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *PAIN®*.
- Perl, E.R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 71–80.
- Persson, A.-K., Gasser, A., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2011). NaV1.7 accumulates and co-localizes with phosphorylated ERK1/2 within transected axons in early experimental neuromas. *Exp. Neurol.* *230*, 273–279.
- Petroff, E.Y., Price, M.P., Snitsarev, V., Gong, H., Korovkina, V., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2008). Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 3140–3144.

- Peyronnet, R., Martins, J.R., Duprat, F., Demolombe, S., Arhatte, M., Jodar, M., Tauc, M., Duranton, C., Paulais, M., Teulon, J., et al. (2013). Piezo1-dependent stretch-activated channels are inhibited by Polycystin-2 in renal tubular epithelial cells. *EMBO Rep.* **14**, 1143–1148.
- Pogorzala, L.A., Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2013). The Cellular Code for Mammalian Thermosensation. *J. Neurosci.* **33**, 5533–5541.
- Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I., and Kellenberger, S. (2006). Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J. Physiol.* **576**, 215–234.
- Poole, K., Herget, R., Lapatsina, L., Ngo, H.-D., and Lewin, G.R. (2014). Tuning Piezo ion channels to detect molecular-scale movements relevant for fine touch. *Nat. Commun.* **5**.
- Poonyachoti, S., Kulkarni-Narla, A., and Brown, D.R. (2002). Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell Tissue Res.* **307**, 23–33.
- Price, M.P., Snyder, P.M., and Welsh, M.J. (1996). Cloning and Expression of a Novel Human Brain Na Channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 7879–7882.
- Price, M.P., Lewin, G.R., McIlwrath, S.L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Mannsfeldt, A.G., Brennan, T.J., Drummond, H.A., et al. (2000). The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* **407**, 1007–1011.
- Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC Cation Channel Contributes to the Detection of Cutaneous Touch and Acid Stimuli in Mice. *Neuron* **32**, 1071–1083.
- Priest, B.T., Murphy, B.A., Lindia, J.A., Diaz, C., Abbadie, C., Ritter, A.M., Liberator, P., Iyer, L.M., Kash, S.F., Kohler, M.G., et al. (2005). Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9382–9387.
- Proudfoot, C.J., Garry, E.M., Cottrell, D.F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D.C., Fleetwood-Walker, S.M., and Mitchell, R. (2006). Analgesia Mediated by the TRPM8 Cold Receptor in Chronic Neuropathic Pain. *Curr. Biol.* **16**, 1591–1605.
- Punke, M.A., Licher, T., Pongs, O., and Friederich, P. (2003). Inhibition of human TREK-1 channels by bupivacaine. *Anesth. Analg.* **96**, 1665–1673, table of contents.
- Raffa, R.B., and Martinez, R.P. (1995). The “glibenclamide-shift” of centrally-acting antinociceptive agents in mice. *Brain Res.* **677**, 277–282.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An Introduction to Trp Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 619–647.
- Ranade, S.S., Qiu, Z., Woo, S.-H., Hur, S.S., Murthy, S.E., Cahalan, S.M., Xu, J., Mathur, J., Bandell, M., Coste, B., et al. (2014). Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 10347–10352.

-
- Razavi, R., Chan, Y., Afifiyan, F.N., Liu, X.J., Wan, X., Yantha, J., Tsui, H., Tang, L., Tsai, S., Santamaria, P., et al. (2006). TRPV1+ Sensory Neurons Control β Cell Stress and Islet Inflammation in Autoimmune Diabetes. *Cell* 127, 1123–1135.
- Reeh, P.W. (1986). Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci. Lett.* 66, 141–146.
- Reid, G., and Flonta, M.-L. (2001). Physiology: Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature* 413, 480–480.
- Reid, G., Babes, A., and Pluteanu, F. (2002). A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J. Physiol.* 545, 595–614.
- Renganathan, M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2001). Contribution of Nav1.8 Sodium Channels to Action Potential Electrogenesis in DRG Neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 629–640.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96, 414–495.
- Rey, R. (2000). *Histoire de la douleur* (Paris: La Découverte).
- Rocha-González, H.I., Herrejon-Abreu, E.B., López-Santillán, F.J., García-López, B.E., Murbartián, J., and Granados-Soto, V. (2009). Acid increases inflammatory pain in rats: Effect of local peripheral ASICs inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 603, 56–61.
- Rodrigues, A.R.A., and Duarte, I.D.G. (2000). The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 129, 110–114.
- Sabatowski, R., Schäfer, D., Kasper, S.M., Brunsch, H., and Radbruch, L. (2004). Pain treatment: a historical overview. *Curr. Pharm. Des.* 10, 701–716.
- Salinas, M., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2009). Structural Elements for the Generation of Sustained Currents by the Acid Pain Sensor ASIC3. *J. Biol. Chem.* 284, 31851–31859.
- Sanders, K., and Kho, S. (2005). Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. *J. Physiol.*
- Sandoz, G., Thümmeler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2006). AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K⁺ channels into open leak channels. *EMBO J.* 25, 5864–5872.
- Sandoz, G., Tardy, M.P., Thümmeler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2008). Mtap2 Is a Constituent of the Protein Network That Regulates Twik-Related K⁺ Channel Expression and Trafficking. *J. Neurosci.* 28, 8545–8552.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14628–14633.

-
- Sandoz, G., Bell, S.C., and Isacoff, E.Y. (2011). Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 2605–2610.
- Sarantopoulos, C., McCallum, B., Sapunar, D., Kwok, W.-M., and Hogan, Q. (2003). ATP-sensitive potassium channels in rat primary afferent neurons: the effect of neuropathic injury and gabapentin. *Neurosci. Lett.* *343*, 185–189.
- Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflüg. Arch.* *451*, 35–42.
- Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2009). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *33*, 205–212.
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., and Basbaum, A.I. (2009). Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. *Cell* *137*, 1148–1159.
- Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H.O., and Torebjörk, H.E. (1997). Specific C-Receptors for Itch in Human Skin. *J. Neurosci.* *17*, 8003–8008.
- Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjörk, E., and Handwerker, H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.* *15*, 333–341.
- Schnorr, S., Eberhardt, M., Kistner, K., Rajab, H., Käßer, J., Hess, A., Reeh, P., Ludwig, A., and Herrmann, S. (2014). HCN2 channels account for mechanical (but not heat) hyperalgesia during long-standing inflammation. *PAIN®* *155*, 1079–1090.
- Serrie, A., and Queneau, P. (2005). *Livre blanc de la Douleur*. Paris: Comité d'Organisation des Etats Généraux de la Douleur.
- Sherrington, C.S. (1903). Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J. Physiol.* *30*, 39–46.
- Shields, S.D., Cheng, X., Üçeyler, N., Sommer, C., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2012). Sodium Channel Nav1.7 Is Essential for Lowering Heat Pain Threshold after Burn Injury. *J. Neurosci.* *32*, 10819–10832.
- Shimosato, G., Amaya, F., Ueda, M., Tanaka, Y., Decosterd, I., and Tanaka, M. (2005). Peripheral inflammation induces up-regulation of TRPV2 expression in rat DRG. *Pain* *119*, 225–232.
- Shin, H.W., Soh, J.S., Kim, H.Z., Hong, J., Woo, D.H., Heo, J.Y., Hwang, E.M., Park, J.-Y., and Lee, C.J. (2014). The inhibitory effects of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on K2P (two-pore domain potassium) channel TREK-1. *J. Anesth.* *28*, 81–86.
- Simkin, D., Cavanaugh, E.J., and Kim, D. (2008). Control of the single channel conductance of K2P10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *J. Physiol.* *586*, 5651–5663.

-
- Simone, D.A., and Kajander, K.C. (1996). Excitation of rat cutaneous nociceptors by noxious cold. *Neurosci. Lett.* 213, 53–56.
- Sluka, K.A., Price, M.P., Breese, N.M., Stucky, C.L., Wemmie, J.A., and Welsh, M.J. (2003). Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106, 229–239.
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186–190.
- Steffenach, H.-A., Witter, M., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45, 301–313.
- Stein, C., and Machelska, H. (2011). Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacol. Rev.* 63, 860–881.
- Stein, C., Pflüger, M., Yassouridis, A., Hoelzl, J., Lehrberger, K., Welte, C., and Hassan, A.H. (1996). No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J. Clin. Invest.* 98, 793–799.
- Stein, C., Machelska, H., and Schäfer, M. (2001). Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z. Für Rheumatol.* 60, 416–424.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819–829.
- Straub, I., Krügel, U., Mohr, F., Teichert, J., Rizun, O., Konrad, M., Oberwinkler, J., and Schaefer, M. (2013). Flavanones That Selectively Inhibit TRPM3 Attenuate Thermal Nociception In Vivo. *Mol. Pharmacol.* 84, 736–750.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., and Plant, T.D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.* 2, 695–702.
- Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., and Mizumura, K. (2002). Bradykinin Lowers the Threshold Temperature for Heat Activation of Vanilloid Receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88, 544–548.
- Sugiura, T., Dang, K., Lamb, K., Bielefeldt, K., and Gebhart, G.F. (2005). Acid-Sensing Properties in Rat Gastric Sensory Neurons from Normal and Ulcerated Stomach. *J. Neurosci.* 25, 2617–2627.
- Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., and McCleskey, E.W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 711–716.
- Suto, K., and Gotoh, H. (1999). Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 92, 1131–1135.

-
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired Pressure Sensation in Mice Lacking TRPV4. *J. Biol. Chem.* 278, 22664–22668.
- Takashima, Y., Daniels, R.L., Knowlton, W., Teng, J., Liman, E.R., and McKemy, D.D. (2007). Diversity in the Neural Circuitry of Cold Sensing Revealed by Genetic Axonal Labeling of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Neurons. *J. Neurosci.* 27, 14147–14157.
- Takashima, Y., Ma, L., and McKemy, D.D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience* 169, 828–842.
- Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., and Bayliss, D.A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7491–7505.
- Terrenoire, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2001). A TREK-1-Like Potassium Channel in Atrial Cells Inhibited by β -Adrenergic Stimulation and Activated by Volatile Anesthetics. *Circ. Res.* 89, 336–342.
- Thomas, D., Plant, L.D., Wilkens, C.M., McCrossan, Z.A., and Goldstein, S.A.N. (2008). Alternative Translation Initiation in Rat Brain Yields K2P2.1 Potassium Channels Permeable to Sodium. *Neuron* 58, 859–870.
- Thümmel, S., Duprat, F., and Lazdunski, M. (2007). Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 284–289.
- Tichenor, J.N., Hansen, E.T., and Buxton, I.L.O. (2005). Expression of stretch-activated potassium channels in human myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 48, 44–48.
- Tillman, D.B., Treede, R.D., Meyer, R.A., and Campbell, J.N. (1995). Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J. Physiol.* 485, 753–765.
- Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A., and Suzuki, M. (2004). Warm Temperature-sensitive Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Plays an Essential Role in Thermal Hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 279, 35133–35138.
- Toledo-Aral, J.J., Moss, B.L., He, Z.-J., Koszowski, A.G., Whisenand, T., Levinson, S.R., Wolf, J.J., Silos-Santiago, I., Halegoua, S., and Mandel, G. (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1527–1532.
- Tominaga, M., and Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* 61, 3–12.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
- Tominaga, M., Wada, M., and Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6951–6956.

-
- Torrecilla, M., Marker, C.L., Cintora, S.C., Stoffel, M., Williams, J.T., and Wickman, K. (2002). G-Protein-Gated Potassium Channels Containing Kir3.2 and Kir3.3 Subunits Mediate the Acute Inhibitory Effects of Opioids on Locus Ceruleus Neurons. *J. Neurosci.* 22, 4328–4334.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1995). Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J. Physiol.* 483, 747–758.
- Trevisan, G., Materazzi, S., Fusi, C., Altomare, A., Aldini, G., Lodovici, M., Patacchini, R., Geppetti, P., and Nassini, R. (2013). Novel Therapeutic Strategy to Prevent Chemotherapy-Induced Persistent Sensory Neuropathy By TRPA1 Blockade. *Cancer Res.* 73, 3120–3131.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., André, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., et al. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13519–13524.
- Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 37, 146–158.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a Novel Prostate-specific Gene, Is Up-Regulated in Prostate Cancer and Other Malignancies and Shares High Homology with Transient Receptor Potential Calcium Channel Proteins. *Cancer Res.* 61, 3760–3769.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., and Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol. Pain* 7, 30.
- Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Nishigaki, M., Shibata, Y., and Shimada, S. (2002). Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J. Clin. Invest.* 110, 1185–1190.
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165, 787–801.
- Veale, E.L., Rees, K.A., Mathie, A., and Trapp, S. (2010). Dominant Negative Effects of a Non-conducting TREK1 Splice Variant Expressed in Brain. *J. Biol. Chem.* 285, 29295–29304.
- Viana, F., de la Peña, E., and Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat. Neurosci.* 5, 254–260.
- Vlachová, V., Teisinger, J., Sušánková, K., Lyfenko, A., Ettrich, R., and Vyklický, L. (2003). Functional Role of C-Terminal Cytoplasmic Tail of Rat Vanilloid Receptor 1. *J. Neurosci.* 23, 1340–1350.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748–754.
- Volkers, L., Mechoukhi, Y., and Coste, B. (2014). Piezo channels: from structure to function. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 1–5.
-

-
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., et al. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* 70, 482–494.
- Walder, R.Y., Rasmussen, L.A., Rainier, J.D., Light, A.R., Wemmie, J.A., and Sluka, K.A. (2010). ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia After Inflammatory Muscle Injury. *J. Pain* 11, 210–218.
- Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., and Lazdunski, M. (1996). The Mammalian Degenerin MDEG, an Amiloride-sensitive Cation Channel Activated by Mutations Causing Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 271, 10433–10436.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997a). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386, 173–177.
- Waldmann, R., Bassilana, F., Weille, J. de, Champigny, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997b). Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na⁺ Channel Specific for Sensory Neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 20975–20978.
- Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2008). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131, 1241–1251.
- Wang, X.M., Yan, J.Q., Zhang, K.M., and Mokha, S.S. (1996). Role of opioid receptors (μ , δ 1, δ 2) in modulating responses of nociceptive neurons in the superficial and deeper dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis) in the rat. *Brain Res.* 739, 235–243.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47044–47051.
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424, 434–438.
- Waxman, S.G., and Zamponi, G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* 17, 153–163.
- Welch, S.P., and Dunlow, L.D. (1993). Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 390–399.
- Welch, E.J., Jones, B.W., and Scott, J.D. (2010). Networking with AKAPs: Context-dependent Regulation of Anchored Enzymes. *Mol. Interv.* 10, 86–97.
- Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., and Welsh, M.J. (2003). Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. *J. Neurosci.* 23, 5496–5502.

-
- Wemmie, J.A., Taugher, R.J., and Kreple, C.J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 461–471.
- Wenk, H. n., and Honda, C. n. (1999). Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. *J. Comp. Neurol.* *408*, 567–579.
- Wetzel, C., Hu, J., Riethmacher, D., Benckendorff, A., Harder, L., Eilers, A., Moshourab, R., Kozlenkov, A., Labuz, D., Caspani, O., et al. (2007). A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature* *445*, 206–209.
- Wolf, S., Barton, D., Kottschade, L., Grothey, A., and Loprinzi, C. (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. *Eur. J. Cancer* *44*, 1507–1515.
- Woo, D.H., Han, K.-S., Shim, J.W., Yoon, B.-E., Kim, E., Bae, J.Y., Oh, S.-J., Hwang, E.M., Marmorstein, A.D., Bae, Y.C., et al. (2012). TREK-1 and Best1 Channels Mediate Fast and Slow Glutamate Release in Astrocytes upon GPCR Activation. *Cell* *151*, 25–40.
- Woodbury, C.J., Zwick, M., Wang, S., Lawson, J.J., Caterina, M.J., Koltzenburg, M., Albers, K.M., Koerber, H.R., and Davis, B.M. (2004). Nociceptors Lacking TRPV1 and TRPV2 Have Normal Heat Responses. *J. Neurosci.* *24*, 6410–6415.
- Wulsch, T., Painsipp, E., Shahbazian, A., Mitrovic, M., Edelsbrunner, M., Lazdunski, M., Waldmann, R., and Holzer, P. (2008). Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach–brainstem axis. *PAIN* *134*, 245–253.
- Xiao, Z., Deng, P.-Y., Rojanathammanee, L., Yang, C., Grisanti, L., Permpoonputtana, K., Weinshenker, D., Doze, V.A., Porter, J.E., and Lei, S. (2009). Noradrenergic Depression of Neuronal Excitability in the Entorhinal Cortex via Activation of TREK-2 K⁺ Channels. *J. Biol. Chem.* *284*, 10980–10991.
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., et al. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* *418*, 181–186.
- Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., and McCleskey, E.W. (2006). Sustained Currents Through ASIC3 Ion Channels at the Modest pH Changes That Occur During Myocardial Ischemia. *Circ. Res.* *99*, 501–509.
- Zhang, H., Shepherd, N., and Creazzo, T.L. (2008). Temperature-sensitive TREK currents contribute to setting the resting membrane potential in embryonic atrial myocytes. *J. Physiol.* *586*, 3645–3656.
- Zhang, X., Huang, J., and McNaughton, P.A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* *24*, 4211–4223.
- Zhang, X.-L., Mok, L.-P., Katz, E.J., and Gold, M.S. (2010). BKCa currents are enriched in a subpopulation of adult rat cutaneous nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 450–462.

-
- Zhang, X.Y., Wen, J., Yang, W., Wang, C., Gao, L., Zheng, L.H., Wang, T., Ran, K., Li, Y., Li, X., et al. (2013). Gain-of-Function Mutations in SCN11A Cause Familial Episodic Pain. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 957–966.
- Zhao, H., Sprunger, L.K., and Simasko, S.M. (2010). Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G212–G221.
- Zhao, X., Tang, Z., Zhang, H., Atianjoh, F.E., Zhao, J.-Y., Liang, L., Wang, W., Guan, X., Kao, S.-C., Tiwari, V., et al. (2013). A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1024–1031.
- Zhou, J., Yang, C.-X., Zhong, J.-Y., and Wang, H.-B. (2013). Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* Febr. 13 2013 24, 131–136.
- Zhou, M., Xu, G., Xie, M., Zhang, X., Schools, G.P., Ma, L., Kimelberg, H.K., and Chen, H. (2009). TWIK-1 and TREK-1 Are Potassium Channels Contributing Significantly to Astrocyte Passive Conductance in Rat Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* 29, 8551–8564.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N., and Reeh, P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447, 856–859.
- Zimmermann, K., Hein, A., Hager, U., Kaczmarek, J.S., Turnquist, B.P., Clapham, D.E., and Reeh, P.W. (2009). Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat. Protoc.* 4, 174–196.
- Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18114–18119.
- Zoga, V., Kawano, T., Liang, M.-Y., Bienengraeber, M., Weihrauch, D., McCallum, B., Gemes, G., Hogan, Q., and Sarantopoulos, C. (2010). KATP channel subunits in rat dorsal root ganglia: alterations by painful axotomy. *Mol. Pain* 6, 6.
- Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthörl, G., Rinné, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., and Preisig-Müller, R. (2009). Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J. Physiol.* 587, 929–952.